

# VALKOSIPULIN LISÄYS JA VIRUSTESTAUS *IN VITRO*

Hanna Toivonen

Opinnäytetyö  
Toukokuu 2011

Laboratorioalan koulutusohjelma  
Tekniikan ja liikenteen ala



JYVÄSKYLÄN AMMATTIKORKEAKOULU  
JAMK UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES



Tekijä(t) TOIVONEN, Hanna	Julkaisun laji Opinnäytetyö	Päivämäärä 31.05.2011
	Sivumäärä 57	Julkaisun kieli suomi
	Luottamuksellisuus ( ) saakka	Verkojulkaisulupa myönnetty ( X )
Työn nimi VALKOSIPULIN LISÄYS JA VIRUSTESTAUS IN VITRO		
Koulutusohjelma Laboratorioalan koulutusohjelma		
Työn ohjaaja(t) VÄRTÖ-NIEMI, Merja, lehtori		
Toimeksiantaja(t) MTT Kasvintuotannon tutkimus, Laukaa. UOSUKAINEN, Marjatta, vanhempi tutkija. LAAMANEN, Jaana, tutkija.		
<p>Tiivistelmä</p> <p>Opinnäytetyön tavoitteena oli lämpökäsitellyn valkosipuliaineiston virustestaus ja lisäys. Työ tehtiin Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskuksessa (MTT) Laukaan toimipisteessä. MTT:ltä työn oli tilannut suomalainen viljelijä. Työn aineistona ollut virussaastunut valkosipulikanta puhdistettiin viruksista lämpökäsittelyllä. Puhdistettujen valkosipuleiden puhtaus testattiin ja pyrittiin löytämään paras lisäämismenetelmä puhdistetulle valkosipuliaineistolle. Työn tilannut viljelijä halusi saada kyseisen valkosipulikannan viruksettomia sipuleita aloittaakseen uudelleen kannan viljelyn.</p> <p>Valkosipuliaineisto testattiin ELISA-testauksella (DAS- ja TAS-ELISA) sekä mehutestauksella. ELISA-testillä testattiin viruksia OYDV, LYSV, SLV, SYSV, GarCLV sekä alleksiviruksia. Mehutestauksella pyrittiin osoittamaan, että valkosipuliaineisto oli virussaastunut ennen aineiston puhdistusta.</p> <p>Valkosipuliaineiston lisääminen toteutettiin varsikiekkomenetelmällä, jota MTT:llä ei ollut ennen kokeiltu. Varsikiekkolisäyksessä jokaisesta sipulista leikattiin ympyrän muotoinen kiekko mikroskoopin alla. Kiekko jaettiin neljään osaan ja saadut palat asetettiin mikroviljelypurkkeihin MSO-alustalle kehittymään.</p> <p>ELISA-testin perusteella valkosipulin kasvupisteistä terveitä oli 80 % ja sairaita 20 %. ELISA-tulosten perusteella valkosipuliaineiston lämpökäsittely onnistui. Mehutestaus ei onnistunut, sillä viruksia ei saatu siirrostettua testikasveihin. Varsikiekkolisäys onnistui, koska sillä saatiin lisättyä valkosipuliaineistoa huomattavasti paremmin kuin aikaisemmin käytetyllä jakamismenetelmällä. Varsikiekkomenetelmä oli toimiva, mutta sitä tulisi testata lisää, jotta se voitaisiin ottaa käyttöön MTT Laukaan toimipisteessä.</p>		
Avainsanat (asiasanat)		
Valkosipuli, kasvivirus, puhdistus, virustestaus, mikrolisäys, varsikiekkomenetelmä		
Muut tiedot		



Author(s) TOIVONEN, Hanna	Type of publication Bachelor's Thesis	Date 31052011
	Pages 57	Language Finnish
	Confidential ( ) Until	Permission for web publication ( X )
Title THE PROPAGATION AND VIRUS INDEXING OF GARLIC IN VITRO		
Degree Programme Laboratory Sciences		
Tutor(s) VÄRTÖ-NIEMI, Merja, Lecturer		
Assigned by MTT Plant Production Research, Laukaa. UOSUKAINEN, Marjatta, Senior Research Scientist. LAAMANEN, Jaana, Research Scientist.		
<p>Abstract</p> <p>The aim of this study was virus indexing and propagation of a Finnish garlic clone. The study was conducted at MTT Agrifood Research Finland's facility at Laukaa. The work was ordered from MTT by a Finnish farmer. At MTT the clone had received thermotherapy in order to eradicate viruses. In this thesis the efficiency of thermotherapy was examined by virus testing and the most efficient way to propagate the virus eradicated garlic material was pursued. This study became essential because the farmer wanted to continue the production of the clone.</p> <p>Virus testing of the garlic material was carried out by using ELISA (DAS- and TAS-ELISA) and a mechanical transmission method. Viruses: OYDV, LYSV, SLV, SYSV, GarCLV and alleksiviruses were screened by ELISA. A mechanical transmission method was used to show that the garlic material was infected by viruses before the thermotherapy.</p> <p>The garlic clone was propagated using the stem-disc culture method that had never been used at MTT before. A round slice was cut under a microscope from each bulb. The slices were divided in four pieces and each piece was put into a micropropagation jar containing MS0-basal medium to let it develop.</p> <p>As a result of ELISA, 80% of the tested propagation lines were virus free and 20% virus infected. According to ELISA results virus eradication by thermotherapy was successful. A mechanical transmission by sap inoculation failed because no symptoms were observed in the indicator plants. The stem-disc culture method worked very well and produced bulbs much more efficiently than the preceding propagation methods. Even though the stem-disc culture method was a success in this study, further research is needed for it to be established as a general method at MTT-Laukaa.</p>		
Keywords		
Garlic, plant virus, purification, virus testing, micropropagation, the stem-disc culture method		
Miscellaneous		

## SISÄLTÖ

1	OPINNÄYTETYÖN LÄHTÖKOHDAT .....	3
2	VALKOSIPULI JA SEN VILJELY SUOMESSA.....	4
3	KASVIVIRUKSET.....	6
3.1	Yleistä kasviviruksista.....	6
3.2	Valkosipulin virukset.....	7
4	PUHDISTUSMENETELMÄT .....	12
4.1	Kasvivirusten torjunta.....	12
4.2	Solukkoviljely.....	13
4.3	Lämpökäsittely .....	14
4.4	Kemoterapia.....	16
4.5	Kryoterapia .....	17
5	TESTAUSMENETELMÄT .....	18
5.1	Taudinaiheuttajan kartoitus .....	18
5.2	ELISA-testaus.....	19
5.2.1	ELISA-testin periaate .....	19
5.2.2	DAS-ELISA .....	20
5.2.3	TAS-ELISA.....	20
5.3	Mehutestaus .....	21
5.4	PCR-menetelmä.....	23
6	VALKOSIPULIN LISÄYS .....	24
6.1	Lisäys avomaalla .....	24
6.2	Mikrolisäys .....	25
6.2.1	Mikrolisäyksen periaate .....	25
6.2.2	Meristeemiviljelmä.....	26
6.2.3	Versonkärkiviljelmä .....	27
6.2.4	Kallusviljelmä .....	27

	2
6.2.5 Varsikiekkomenetelmä.....	28
7 VALKOSIPULIAINEISTO.....	28
8 AINEISTON PUHDISTUS JA TERVEYDEN TESTAUS .....	30
8.1 Lämminilmakäsittely .....	30
8.2 ELISA-testaus.....	30
8.3 Mehutestaus .....	31
9 AINEISTON LISÄYS .....	32
10 TULOKSET .....	34
10.1 ELISA-testaus.....	34
10.2 Mehutestaus .....	36
10.3 Aineiston lisäys.....	37
11 JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA .....	40
11.1 Tulosten tarkastelu.....	40
11.2 Tulevaisuuden näkymiä.....	43
LÄHTEET. ....	44
LIITTEET. ....	46
Liite 1. Mehutestausohje valkosipulille. ....	46
Liite 2. ELISA-testausohje .....	48
Liite 3. Kaikkien ELISA-testien tulokset. ....	54

## 1 OPINNÄYTETYÖN LÄHTÖKOHDAT

Virustaudit ovat erityisen merkityksellisiä monivuotisissa ja suvuttomasti lisättävissä kasveissa, kuten Valkosipulissa (*Allium sativum* L.). Tällöin virustartunnalla on mahdollisuus runsastua, kun viljely jatkuu vuodesta toiseen. Lopulta koko kasviaineisto voi olla viruksen tartuttama. Suomessa useat valkosipulikannat ovat täysin viruksen tartuttamia, koska valkosipulia lisätään suvuttomasti istuttamalla sipulinkynsiä. (Valkonen, Bremer & Tapio 2005, 64.)

Suomalaisen viljelijän valkosipulikanta oli virussaastunut ja sen seurauksena taantunut niin, että kannan viljely piti lopettaa. Viljelijä tilasi valkosipulikannan puhdistuksen MTT (Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus) Laukaan toimipisteeltä, toiveenaan saada riittävä määrä puhdistettuja valkosipuleita, jotta kannan viljelyn voisi aloittaa uudelleen.

MTT on Suomen johtava maatalous- ja elintarviketutkimusta sekä maatalouden ympäristöntutkimusta tekevä laitos. MTT toimii maa- ja metsätalousministeriön alaisuudessa. MTT:n tuotteita ovat innovaatiot ja ongelmanratkaisut, jotka liittyvät uusiutuviin luonnonvaroihin. Päätoimipaikkana on Jokioinen. MTT:llä on noin 750 työntekijää 14 toimipaikalla eri puolilla Suomea. (Innovaatiota uusiutuvista luonnonvaroista 2009.) Laukaan toimipisteen tutkimusalueena on puutarhatuotanto ja se kuuluu MTT:n kasvintuotannon tutkimusyksikköön. Laukaan toimipisteen tehtävänä on vastata Suomen varmennetun taimituotannon menetelmäkehityksestä, ydinkasviaineiston puhdistuksesta, ydinkasvipankista sekä taimien tuotantomenetelmistä ja puutarhakasvien geenivarojen kryosäilytyksestä. (MTT Laukaa 2009.)

Viljelijän valkosipulikanta puhdistettiin lämpökäsittelyllä ja opinnäytetyön tavoitteena oli lämpökäsittelyn valkosipuliaineiston virustestaus ja lisäys. Viruspuhdistettujen valkosipuleiden puhtaus testattiin ja pyrittiin löytämään paras lisäysmenetelmä puhdistetulle valkosipuliaineistolle. Valkosipuliaineisto testattiin ELISA- ja mehutestauksella. Aineiston lisääminen päätettiin toteuttaa varsikiekkomenetelmällä,

kun menetelmää oltiin ensin kokeiltu kahdella MTT:n mikroviljelmissä olleella valkosipulilajikkeella sekä yhdellä varsinaisen valkosipuliaineiston sipulilla. Lisäämistä varsikiekkomenetelmällä ei ollut ennen kokeiltu MTT:llä. Varsikiekkomenetelmän päätavoitteena oli saada lisättyä valkosipulia enemmän kuin aiemmin käytetyllä jakamismenetelmällä.

## 2 VALKOSIPULI JA SEN VILJELY SUOMESSA

Valkosipuli (*Allium sativum* L.) kuuluu sipuleiden sukuun. Se on suosittu maustevihannes ja sitä viljellään Suomessa yleisesti kotipuutarhoissa sekä jonkin verran kaupallisesti. Valkosipuli sisältää paljon rikkipitoista alliinia. Solujen rikkoutuessa alliinista syntyy muita kirpeän ja voimakkaan hajun ja maun antavia yhdisteitä. (Ahokas, Galambosi, Kairikko, Kallela, Sahramaa, Suojala-Ahlfors, Valo & Veteläinen 2006, 22.) Valkosipuli sisältää myös eteerisiä öljyjä ja C-vitamiinia (Puutarha.net n.d.). Rikkipitoisilla yhdisteillä on todettu olevan bakteereja tuhoava vaikutus, ja valkosipulia on käytetty erilaisten tulehdusten hoidossa. Aiemmin sitä käytettiin erityisesti lääkinnällisten ominaisuuksiensa takia. (Ahokas ym. 2006, 22.)

Valkosipulilla on pitkät lehdet, jäykkä varsi (ks. kuvio 1) ja sen kukinto on harvakukkainen sarjakukinto (Puutarha.net n.d.). Valkosipulissa pienet kynsimäiset turvonneet hankasilmut muodostavat kyhmyisen sipulin, jota peittää kalvo. Turvonneet hankasilmut säilyttävät vararavintoa ja toimivat lisääntymiseliminä. Yksi kynsi koostuu kahdesta turvonneesta lehdestä sekä silmusta, joka tuottaa seuraavan vuoden kasvun. Yhdessä valkosipulissa on keskimäärin 8–15 kynttä. Suomessa pitkän päivän olosuhteissa sipulinmuodostus alkaa aikaisin. (Ahokas ym. 2006, 22.)

Suomessa valkosipulia on viljelty jo 1500-luvun lopulta lähtien (Puutarha.net n.d.). Vuonna 2010 valkosipulia viljeltiin 12 hehtaarin pinta-alalla Suomessa 58 yrityksen toimesta (Vihannesviljely avomaalla 2010). Suurimmaksi osaksi Suomessa kulutettu valkosipuli on ulkomailta tuotua.

Suomessa valkosipuli tulee istuttaa varhain keväällä sen pitkän kasvuaikavaatimuksen takia. Etelä-Suomessa valkosipulit tulee istuttaa huhtikuun lopusta toukokuun alkuun ja Pohjois-Suomessa toukokuun loppuun mennessä. Kasvin lehtien kasvu alkaa hitaana jo 0 °C:ssa, eikä kasvi ole kylmänarka. (Ahokas ym. 2006, 24.)

Valkosipulilla tavataan runsaasti erilaisia kasvitauteja, kuten myös muilla sipulilajeilla. Valkosipulilla yleinen tauti on myös maalevintäinen sipulinfusaroosi (*Fusarium oxysporum* Schlecht). Varastoinnin aikana yleisiä tauteja ovat viherhome ja harmaahome. Lisäksi valkosipuleilla esiintyy monia virustauteja. Tuholaiset eivät aiheuta valkosipulille juurikaan harmia. Joskus saattaa esiintyä sipulikoita ja ripsiäisiä. (Ahokas ym. 2006, 22–23.)

Valkosipulin monimuotoisuutta ei ole perusteellisesti selvitetty Suomessa. Lajilla kuitenkin tiedetään olevan lukuisia kantoja, jotka poikkeavat toisistaan. Havaitut erot ovat mm. sadon määrässä, aikaisuudessa, kynsien muodossa ja koossa, kukinta-alttiudessa, virusalttiudessa sekä sipulin kuoren värissä. Värin perusteella valkosipulit voidaan jakaa valko- ja sinipunakuorisiin kantoihin. Istutuksen ajankohdan mukaan valkosipulityypit voidaan jakaa kevät- ja syysistutukseen soveltuviksi. Usein kannat nimetään viljelypaikkakunnan tai viljelijän mukaan. (Ahokas ym. 2006, 23.)



KUVIO 1. Poimittuja valkosipuleita (Uutta tietoa valkosipulin terveellisyydestä verisuonistolle 2007)



### 3 KASVIVIRUKSET

#### 3.1 Yleistä kasviviruksista

Kasvivirukset ovat viroidien lisäksi rakenteeltaan ja toiminnoiltaan yksinkertaisimpia kasvitautien aiheuttajia. Kasvivirukset ovat täysin riippuvaisia elävästä kasvisolusta, vaikka ne lisääntyvätkin omien geenitoimintojensa avulla. Virukset ovat loisia kasvisolussa, sillä ne käyttävät kasvin geenituotteiden valmistamiseen tarkoitettua biologista koneistoa omaan lisääntymiseensä kasvisoluissa. Suurin osa kasveja tartuttavista viruksista koostuu kahdesta pää rakenneosasta: perintöainesmolekyylistä, joka on RNA:ta tai DNA:ta (harvemmin), sekä proteiini kuoresta, jonka sisään perintöainesta on paketoitu. Tavallisesti kasviviruksen perimä koostuu alle kymmenestä geenistä, jotka koodittavat proteiinien tuotannon viruksen elintärkeisiin toimintoihin. (Valkonen ym. 2005, 52–54.)

Kasvivirustartunnan edellytyksenä on viruksen joutuminen elävään kasvisoluun. Usein virus kulkeutuu kasvisoluun, kun virusta kantava hyönteinen tai ankeroinen läpäisee kasvin soluseinän imukärsällä imeäkseen ravintoa ja samalla siirtää viruksia soluun. Monet virukset voivat kulkeutua soluihin myös haavojen kautta ja aiheuttaa tartunnan. Joidenkin sienten parveilutiöt kantavat viruksia, jotka pääsevät kasvin juurisoluihin sieni-itiön tartuttaessa juurta. Juurten kautta kasveihin voi päästä myös ojissa sekä kasteluvedessä kulkeutuvia kestäviä virushiukkasia. (Valkonen ym. 2005, 76.)

Tartunnan jälkeen virustaudin kehittyminen edellyttää viruksen monistumista kasvisolussa. Viruksen on kyettävä siirtymään viereisiin soluihin ja muihin kasvinosiin. Yleensä virukset eivät tartuta kasvin kasvupisteitä, mutta jotkut virukset pystyvät kuitenkin tietyissä kasveissa tartuttamaan alkion ja siitepölyn. (Valkonen ym. 2005, 76, 77.)

Virustaudin edetessä kasvin lehdissä voi ilmetä erilaisia oireita. Oireet voivat olla esimerkiksi mosaiikkimaista viherkatoa, kellastumista, kiertymistä ja käpertymistä. Tauti voi aiheuttaa myös kasvun hidastumista, kasvin pensaistumista tai muuten epänormaalia kasvua. (Valkonen ym. 2005, 77.)

Yleensä kasvivirukset on nimetty niille tyypillisen isäntäkasvin ja siinä aiheutuvien oireiden perusteella. Nimettyjä ja ominaisuuksiltaan suhteellisen hyvin tunnettuja kasviviruksia on noin 600. Suomessa noin 50 virusta on tunnistettu viljellyissä tai luonnonkasveissa. Lisäksi tunnetaan monia kasvitauteja, joiden aiheuttajiksi epäillään viruksia tai viroideja. Kasvivirusten kestävyys kasvisolun ulkopuolella vaihtelee suuresti. Osa kasviviruksista säilyy pitkään tartutuskykyisenä kasvisolun ulkopuolella, mutta monien virusten kestävyys on kuitenkin huono, ja ne säilyvät tartutuskykyisinä vain muutamia minuutteja tai tunteja joutuessaan ulkopuolelle kasvisolusta. (Valkonen ym. 2005, 52, 54.)

Erityisen merkityksellisiä virustaudit ovat monivuotisissa kasveissa, joita lisätään suvuttomasti, sillä virustartunnalla on mahdollisuus runsastua viljelyn jatkuessa vuodesta toiseen. Melko tavallista on, että lopulta koko kasviaineisto on viruksen saastuttama. Suomessa useat valkosipulikannat ovat täysin viruksen tartuttamia, koska valkosipulia lisätään suvuttomasti istuttamalla sipulinkynsiä. (Valkonen ym. 2005, 64.)

### 3.2 Valkosipulin virukset

Valkosipulin virusten perimä on yleensä RNA:ta. Valkosipulin virukset voivat siirtyä kasvista toiseen mekaanisesti, siemenen tai sipulin mukana tai hyönteisen välityksellä (kirvat, punkit, kaskaat). Yleisiä oireita, joita valkosipulin virukset aiheuttavat valkosipuleissa ovat laikut ja viirut, epämuodostumat sekä kasvin normaalin kasvun estyminen. Laikut ja viirut voivat olla vaalean vihreitä, tumman vihreitä tai keltaisia alueita. (Schwartz & Mohan 1995, 6.)

Vuosina 1988–1991 Helsingin yliopistossa kartoitettiin virukset ELISA-testillä 24:stä Suomessa viljellystä valkosipulikannasta sekä kuudesta muualta tuodusta kannasta. Kaikki kannat olivat infektoituneet yhdellä tai useammalla seuraavista viruksista; *Onion yellow dwarf virus* (OYDV), *Shallot latent virus* (SLV), *Garlic mosaic virus* (GMV), *Garlic latent virus* (GLV) ja *Leek yellow stripe virus* (LYSV). Riippumatta kantojen alkuperistä yleisin virus oli OYDV, joka löytyi 90 %:sta tutkituista kannoista. (Kokkola 1992.)

### Sipulin keltakääpiökasvivirus (OYDV)

Sipulin keltakääpiökasvivirus, *Onion yellow dwarf virus* (OYDV), kuuluu potyvirusten ryhmään. Viruksen kiemuraiset ja säikeiset viruspartekkelit ovat noin 775 nm pitkiä. Virus voi olla todella vahingollinen sille altistuville sipuleiden ja salottisipuleiden sadoille. Monissa maissa viruksen esiintymistiheydeksi sipuleissa on raportoitu jopa 50 %. Virusta esiintyy yleisesti myös valkosipulilla. OYDV on nimetty ja kuvailtu virustaudiksi vuonna 1929 Iowassa USA:ssa. Taudin esiintyminen raportoitiin kuitenkin ensimmäistä kertaa jo vuonna 1919 USA:n Länsi-Virginiassa. Sipulilla viruksen aiheuttaman taudin tiedetään voivan alentaa sadon, siementen ja sipulien laatua. Valkosipulilla viruksen on raportoitu aiheuttavan vaikeaa mosaiikkia (mosaiikkimainen oire, jonka yksi tai useampi virus yhdessä aiheuttavat kasvin lehtiin), silloin kun kasvissa on muitakin viruksia. (Allium spp. n.d., 28; Schwartz & Mohan 1995, 40.)

Sipulissa ja salottisipulissa tärkein oire on kasvien kääpiökasvuisuus. Lehdissä ilmenee keltaisuutta, joka voi olla epäsäännöllistä keltaista raitaa tai lehden melkein täydellistä kellastumista. Lehdet voivat myös kihartua alaspäin sekä litistyä tai rypistyä. Virus aiheuttaa vaikeaa mosaiikkia ja kasvun estymistä. Valkosipulilla oireet vaihtelevat todella heikoista kloroottisista raidoista kirkkaan keltaisiin raitoihin riippuen virusyksilöryhmästä ja valkosipulilajikkeesta. Valkosipulilla oireena esiintyy myös kasvun heikentymistä ja sipulin koon pienenemistä. Oireet saattavat pahentua jos valkosipulissa on muitakin viruksia. (Allium spp. n.d., 28.) Viruksen valkosipulille aiheuttamat vaikutukset ovat hieman epäselvät, koska valkosipulit ovat usein monen viruksen tartuttamia ja järjestelmällistä tutkimusta yksittäisten virusten aiheuttamasta infektiosta ei ole tehty (Schwartz & Mohan 1995, 41).

Viruksella ei ole kovin monia isäntäkasveja. Virus infektoi *Allium*-suvun lajeja, mutta ei purjoa. Virusta on tavattu sipuleissa, valkosipulissa, muutamissa koristesipuleissa sekä salottisipuleissa. Kokeellisesti virusta on siirrostettu *Chenopodium murale* L. -kasviin. Viruksen levinneisyys on maailmanlaajuinen. OYDV:n aiheuttamaa tautia on tavattu useimmissa maissa, joissa sipuleita viljellään. (Allium spp. n.d., 29.)

Virus leviää yli 50 kirvalajin ja kasvimehun välityksellä. Siementartuntaa ei ole raportoitu sipulilla. Viruksen luonnollinen leviäminen tapahtuu pääasiassa kirvojen välityksellä ja infektoituneen kasvin vegetatiivisen lisääntymisen kautta. Virus

selviytyy sipuleissa, sipulin istukkaissa ja viljelyksiltä levinneissä sipuleissa. Virus ei pysty leviämään siementen tai siitepölyn kautta. (Schwartz & Mohan 1995, 41.)

### Salotin latenttivirus (SLV)

Salotin latenttivirus, *Shallot latent virus* (SLV), kuuluu carlavirusten ryhmään. Sen hieman mutkittelevat ja säikeiset viruspartikkelit ovat noin 650 nm pitkiä. Viruksella merkitys sadolle yksin on vähäinen, mutta yhdessä muiden virusten kanssa se saattaa aiheuttaa vakavaa satotappiota. Virus on ensimmäistä kertaa raportoitu salottisipulissa Hollannissa vuonna 1978. Viruksen aiheuttamaa tautia on havaittu myös sipulissa, purjossa sekä valkosipulissa. (*Allium* spp. n.d., 30; Schwartz & Mohan 1995, 41.)

Valkosipulit, salottisipulit, sipulit ja purjot ovat periaatteessa oireettomia, jos niissä on yksin SLV. Oireet, joita potyviruset aiheuttavat kasveihin, saattavat pahentua jos kasvi on infektoitunut myös SLV:lla. Virus infektoi monia kasveja Alliaceae-heimossa. Virusta esiintyy etupäässä salottisipulissa ja valkosipulissa, mutta sitä on löydetty muistakin *Allium* lajeista. Virus on aiheuttanut paikallisia oireita kasveissa *Chenopodium* spp, *Celosia argentea*, *Vicia faba*. Systeemisesti virus infektoi *Nicotiana occidentalis* ja *N. hesperis* kasveja sekä monia Alliaceae-heimon kasveja. SLV on laajasti levinnyt monissa Aasian ja Euroopan maissa. Virus on raportoitu myös Meksikossa. (*Allium* spp. n.d., 30.)

Luonnossa virus voi levitä kasvimehun ja kirvojen välityksellä. Kuitenkin SLV:n tarttuminen kirvojen välityksellä on vähemmän tehokasta kuin potyvirusien, sillä kirvat eivät siirrä SLV:tä niin tehokkaasti kuin potyvirusia. Luonnonmukaisissa olosuhteissa viruksen leviäminen ja säilyminen tapahtuu pääasiassa vegetatiivisen lisääntymisen kautta, erityisesti valkosipulilla ja salottisipulilla. Viruksen leviämistä siementen välityksellä ei ole raportoitu. Kokeellisesti virusta on myös siirretty kirvan *Myzus ascalonicus* avulla sekä mahdollisesti myös kirvan *Aphis fabae* avulla. Virus siirtyy helposti kasvimehun mukana ja saa aikaan paikalliset oireet noin kymmenessä päivässä kasveissa *Chenopodium album*, *C. amaranticolor* ja *C. quinoa*. (*Allium* spp. n.d., 30; Schwartz & Mohan 1995, 41.)

### Valkosipulin piilovirus (GarCLV)

Valkosipulin piilovirus (ei vielä virallinen suomenkielinen nimi), *Garlic common latent virus* (GarCLV), kuuluu carlavirusien ryhmään. Viruksen säikeiset partikkelit ovat noin 650 nm pitkiä ja hieman mutkittelevia. Yksin esiintyessään kasvissa sen merkitys on vähäinen, mutta esiintyessä yhdessä muiden virusten kanssa voi aiheuttaa merkittävää satotappiota. Virusta esiintyy yleisesti valkosipulilajikkeilla Euroopassa, Etelä- ja Keski-Amerikassa, Intiassa ja Kiinassa. Viruksen aiheuttamat oireet ovat heikot tai oireita ei ole ollenkaan, kun valkosipuli tai purjo on yksin GarCLV:n infektoima. Esimerkiksi purjolla GarCLV voi pahentaa potyvirusien aiheuttamia oireita. GarCLV:lla on laaja isäntävalikoima Alliaceae-heimossa. Lähinnä virus esiintyy valkosipulissa, mutta sitä on löydetty yli 50:stä *Allium*-lajista. Kokeellisesti virusta on siirretty esimerkiksi *Chenopodium quinoa* ja *C. amaranticolor* kasveihin sekä joihinkin muihin *Chenopodium*-lajeihin. Kokeellisesti sitä on siirretty myös *Celosia argentea* ja *Nicotiana occidentalis* kasveihin ja useisiin Alliaceae-heimon lajeihin. (*Allium* spp. n.d., 19.)

Virus on yleismaailmallinen. Virusta on havaittu useimmissa valkosipulia kasvattavissa maissa, mutta ei Japanin, Taiwanin ja Thaimaan perinteisillä valkosipulilajikkeilla. Näissäkin maissa virusta voidaan kuitenkin löytää muualta tuoduista valkosipulilajikkeista. On epäilty, että virus leviää kirvojen välityksellä. GarCLV voidaan siirtää kasviin mekaanisen siirrostuksen avulla, joskin siirrostaminen on vaikeaa. Viruksen leviämistä siementen välityksellä ei ole raportoitu. Sipulilajeilla viruksen tartunta tapahtuu pääasiassa vegetatiivisen lisääntymisen kautta, erityisesti valkosipulilajikkeilla. (*Allium* spp. n.d., 19.)

### Purjon keltajuovavirus (LYSV)

Purjon keltajuovavirus, *Leek yellow stripe virus* (LYSV), kuuluu potyvirusien ryhmään. Sen mutkittelevat ja säikeiset viruspartikkelit ovat noin 820 nm pitkiä. (Leek yellow stripe virus 1981.) Merkittävää viruksen leviämistä tapahtuu alueilla, jossa viljellään koko vuoden ympäri kaupallisia viljelykasveja. LYSV voi aiheuttaa sadon vähentymistä jopa 50 prosentilla. Keltaiset juovat aiheuttavat myös laadullista tappiota. Virus saattaa aiheuttaa 15-50 % vähentymistä valkosipulin sipulisadossa, riippuen lajikkeesta. (*Allium* spp. n.d., 23.) Luonnossa virus näyttää suurelta osin

rajoittuvan infektoimaan purjoa (*Allium porrum*). Virus voi aiheuttaa purjolla koko lehtien kellastumisen. (Leek yellow stripe virus 1981.)

Valkosipulissa virus aiheuttaa epäsäännöllisiä vaalean- ja tummanvihreitä raitoja nuoriin lehtiin. Raidat muuttuvat lehtien vanhetessa keltaisiksi, varsinkin lehtien reunaosissa. Virus ei merkittävästi vaikuta valkosipulin korkeuteen, mutta pienentää sipuleiden halkaisijaa. Samanaikainen infekti OYDV:n kanssa korostaa oireita, jolloin on mahdotonta erottaa ovatko oireet LYSV:n ja OYDV:n yhdessä aiheuttamia vai yksin OYDV:n aiheuttamia. (*Allium* spp. n.d., 24.)

LYSV infektoi *Allium* lajeja; purjoa, valkosipulia, kesäpurjoa, hillosipulia, kuten myös monia villejä lajeja sekä koristeellisia *Allium* lajeja. Kokeellisesti virusta on siirrostettu *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *C. murale* ja *C. album* kasveihin, joihin on kehittynyt paikallisia oireita. Virusta on havaittu useimmissa niissä maissa, joissa valkosipulia kasvaa. (*Allium* spp. n.d., 24.) Virus on laajalle levinnyt useissa Euroopan maissa, luultavasti se on levinnyt maailmanlaajuisesti. Virus leviää kirvan ja kasvimehun välityksellä. (Leek yellow stripe virus 1981.)

### **Salotin keltajuovavirus (SYSV)**

Salotin keltajuovavirus (ei vielä virallinen suomenkielinen nimi), *Shallot yellow stripe virus* (SYSV), kuuluu potyvirusten ryhmään. Viruspartikkelit ovat mutkittelevia ja noin 700-800 nm pitkiä. Viruksen taloudellista merkitystä ei ole selvitetty. Virus aiheuttaa vain lieviä oireita kasveissa. Esimerkiksi salottisipulilla virus aiheuttaa lievää juovaa nuorissa lehdistä ja selvästi erotettavaa mosaiikkimaista keltaista juovaa sipulilla. Viruksen isäntakasveja ovat salottisipuli, ryvässipuli, kiinalainen ruohosipuli, valkosipuli ja valkoruohosipuli. Kokeellisesti SYSV on aiheuttanut vakavaa epämuodostumaa, kääpiökasvuisuutta, nekroosia (kuoliota) ja joskus myös kasvin kuoleman keltasipulilla Stuttgarter Riesen. Valkosipulilla SYSV on aiheuttanut keltaista juovaisuutta ja naateissa syöpymisen kaltaista vioitusta. *Welsh onion yellow stripe virus* on aiheuttanut paikallisia vammoja testikasveissa *Chenopodium quinoa* ja *C. amaranticolor*. (*Allium* spp. n.d., 32.)

Virus on laajalle levinnyt Aasiassa. Virusta on siirrostettua mekaanisella siirrostuksella ja kirvojen välityksellä. Viruksen luonnollinen leviäminen tapahtuu

infektoituneen lisäysmateriaalin välityksellä. Viruksen leviämisestä siementen välityksellä ei ole tietoa. (*Allium* spp. n.d., 32.)

### **Valkosipulin virukset A, B, C, D, E ja X**

Alleksivirusten ryhmään kuuluvia valkosipulin viruksia on löydetty kuusi: Valkosipulivirus-A (*Garlic virus* -A), Valkosipulivirus-B (*Garlic virus* -B), Valkosipulivirus-C (*Garlic virus* -C), Valkosipulivirus-D (*Garlic virus* -D), Valkosipulivirus-E (*Garlic virus* -E) ja Valkosipulivirus-X (*Garlic virus* -X) (suomenkieliset nimet eivät vielä ole virallisia). Viruksista käytetään lyhenteitä GarV-A, GarV-B, GarV-C, GarV-D, GarV-E ja GarV-X. Niiden kaikkien perintöaines on RNA:ta. Viruksia on tavattu ainakin Japanissa, Argentiinassa, Kiinassa, Koreassa ja Italiassa. Valkosipulin virukset A, B, C, D, E ja X saattavat aiheuttaa merkittävää tappiota sadon tuotossa. Virukset leviävät punkkien (*Aceria tulipae*) välityksellä. Punkki on havaittu Suomessa sipulilla (*Allium cepa* L.) jo 1940-luvulla. GarV-B ja GarV-C löydettiin Suomesta vuonna 2009 ELISA-testin avulla testattaessa viljelijän kantaa, jossa oli voimakkaat oireet ja testattaessa oireetonta vanhaa suomalaista 'Heimala' valkosipulilajiketta. (Lemmetty, Laamanen, Soukainen & Tegel 2011, 36.)

## **4 PUHDISTUSMENETELMÄT**

### **4.1 Kasvivirusten torjunta**

Virusten torjuntaan viljelyksillä ei voida käyttää kemiallista torjuntaa. Sen sijaan torjunta perustuu kestäviin lajikkeisiin, tartunnan välttämiseen ja puhdistusmenetelmiin. Puhdistusmenetelmät ovat tarpeellisia, sillä terve lisäysaineisto (siemenet, mukulat, sipulit ja taimet) on terveen kasvuston edellytys. (Valkonen ym. 2005, 62, 132.)

Virus voidaan hävittää tartunnan saaneesta kasvista käyttämällä lämpöterapiaa tai kemiallista terapiaa. Puhdistettavien kasvien kasvatus korkeahkossa lämpötilassa, parin viikon ajan, saattaa riittää terapiaksi. Usein kuitenkin joudutaan käyttämään vaativampaa terapiaa. Terapiassa voidaan eristää kasvin verson kasvupisteitä ja kasvattaa niitä solukkoviljelyalustalla, johon on lisätty kemikaaleja. Solukkoviljely voidaan tehdä kasville normaalissa tai normaalia korkeammassa lämpötilassa. Terapiamenetelmät ovat sopivia parannettaessa yksittäisiä kasveja ja tuotettaessa viruksettomia ydinkasviaineistoja. Ydinkasveja voidaan monistaa solukkoviljelyllä, jotta myyntiin saadaan riittävä määrä tervettä lisäysaineistoa. Terveen lisäysaineiston tuottaminen ja sen käyttö on merkittävä torjuntakeino virustaudeille. (Valkonen ym. 2005, 62.)

## 4.2 Solukkoviljely

Solukkoviljely yhdistettynä lämpökäsittelyyn on tärkeä menetelmä tuotettaessa viruksettomia kasveja. Solukkoviljelyä yksinään on käytetty myös laajasti tuotettaessa viruksettomia kasveja lukuisien lajien infektoituneista yksilöistä. Pohjimmiltaan menetelmä koostuu siitä, että infektoituneesta emokasvista eristetään sopiva osa, jota viljellään aseptisesti ravintoalustalla, jolloin siitä kehittyy kasvin alku ja lopuksi kehittynyt kasvi voidaan istuttaa kasvualustaan. Useimmat käytetyt viljelyalustat perustuvat Murashige-Skoog (MS) alustaan (Murashige & Skoog 1962, 473–497), jota on käytetty menestyksekkäästi monien eri kasvilajien viljelyssä. Viljelyaine voi olla nestemäinen tai kiinteä. Nestemäisen viljelyaineen päälle viljelmät voidaan kannattaa suodatinpaperisillan avulla. Viljelyaineesta saadaan kiinteä lisäämällä siihen agar. (Walkey 1985, 270–271.)

Erilaisia solukkotyyppejä on viljelty tuotettaessa viruksettomia kasveja infektoituneista kasveista. Solukkoviljelyssä ollaan viljelty kallussolukkoa, protoplasteja, erilaisia lisääntyviä solukoita ja meristeemikärkisolukoita. (Walkey 1985, 271.)

Meristeemisolukkoviljely on merkittävin ja tehokkain solukkoviljely menetelmä tuotettaessa viruksettomia kasveja (Walkey 1985, 272). Kasvin verson meristeemi



sisältää yleensä hyvin vähän viruksia tai voi olla jopa täysin virukseton. Tämän ajatellaan olevan pääsyy siihen, miksi meristeemikärjistä kasvatetut kasvit ovat viruksettomia. (George 1993, 145.) Sopivalla alustalla meristeemisolukosta kasvaa nopeammin kasvin alkuja kuin solukoista, joita käytetään muissa solukkoviljelymenetelmissä. Meristeemisolukkoviljelyn merkittävin etu on se, että yleensä tuotetut kasvit ovat geneettisesti emokasvin kaltaisia. (Walkey 1985, 272.)

Kun meristeemisolukkoviljelyn avulla tuotettiin ensimmäistä kertaa viruksettomia kasveja, oletettiin, että tuotetut kasvit ovat terveitä, koska virukset eivät tunkeudu silmun meristeemisolukkoon. Tiedetään, että jotkin virukset tunkeutuvat meristeemikärkeen vaihtelevasti riippuen viruksesta ja isäntäkasvista.

Meristeemialoituksen koko voi näin vaikuttaa siihen, onnistutaanko meristeemisolukkoviljelyn avulla tuottamaan viruksettomia kasveja. Yleisesti ottaen mitä pienempi on kasvista leikattu meristeemikärki, jota viljellään, sitä enemmän saadaan viruksettomia kasveja. Joissakin tapauksissa on mahdotonta eristää infektoituneesta kasvista niin pientä meristeemikärkeä, ettei siihen olisi tunkeutunut viruksia, jolloin on mahdotonta kasvattaa viruksetonta kasvia. Joillakin virus-isäntäyhdistelmillä virukset voidaan hävittää meristeemikärjistä solukkoviljelyn aikana, vaikka meristeemikärki olisikin infektoitunut viruksilla. (Walkey 1985, 274.)

Suurista virusta sisältävistä meristeemikärjistäkin voidaan saada kasvatettua viruksettomia kasveja, kun käytetään lämpökäsittelyä yhdessä meristeemisolukkoviljelyn kanssa. Yleensä lämpökäsittely tehdään infektoituneelle emokasville ennen meristeemikärkien eristämistä, mutta myös viruksia sisältävän meristeemikärjen lämpökäsittely solukkoviljelyn aikana on mahdollista. (Walkey 1985, 275.)

### **4.3 Lämpökäsittely**

Lämpökäsittelyä on käytetty paljon tuottaessa viruksettomia kasveja (Walkey 1985, 263). Lämpökäsittelyt tehdään kasveille, kasvinosille tai kasvin kasvuympäristölle. Korkean (tai matalan) lämpötilan käyttö on kasvitautien fysikaalinen

torjuntamenetelmä. Lepotilassa olevat kasvinosat kestävät kasvavia kasveja paremmin ääreviä lämpötiloja. (Valkonen ym. 2005, 137.)

Lämminilmakäsittelyssä emokasveja pidetään kuumassa ilmassa 35–40 °C:ssa 2–4 viikkoa, minkä jälkeen niistä otetaan pistokkaita, kasvisolukkoja tai kasvupisteitä. Walkeyn (1985, 262) mukaan käsittely suoritetaan 30–40 °C:ssa 6–12 viikkoa. Muutamien virusten kohdalla saatetaan kuitenkin tarvita useiden kuukausien pituinen lämminilmakäsittely, jotta virus saadaan hävitettyä. Monet virukset saadaan toisinaan tuhottua kasvista pelkällä lämpökäsittelyllä, eikä täydentävää kasvisolukkoviljelyä tarvita. (Valkonen ym. 2005, 138.) Lämpökäsittelyä varten on tärkeää valita lämpötila, joka on korkeampi kuin kasvin optimaalinen kasvulämpötila, mutta ei tappava kasville (George 1993, 149). Usein on mahdotonta tuhota virus kokonaisesta kasvista ilman, että kasvi vahingoittuu vakavasti tai kuolee (Walkey 1985, 263).

Lämpökäsittely yhdistetään hyvin yleisesti meristeemisolukkoviljelymenetelmän kanssa virusten poistamista varten. Kokonaisia kasveja kasvatetaan kohotetussa lämpötilassa. (George 1993, 150.) Lämpökäsittelyn aikana 30–40 °C:ssa viruksen replikaatio keskeytyy tartunnan saaneessa kasvissa. Kasvin nuoret versot jatkavat kuitenkin kasvuaan lämpökäsittelyn aikana, jolloin uudet versot ovat vapaita viruksesta, jota on edelleen kasvin vanhemmissa osissa. Kun kasvista lämpökäsittelyn jälkeen eristetään versot tai silmut (meristeemialoitukset), voidaan niistä edelleen kasvattaa kasveja, jotka ovat viruksettomia. (Walkey 1985, 264–265.) Emokasvin lämpökäsittelyn ja meristeemialoituksen yhdistelmä on tehokkaampi viruspuhdistusmenetelmä, kuin kumpikaan menetelmä erikseen (George 1993, 150).

Kun tarkastellaan kasvivirusten hävittämistä lämmön avulla on tärkeää erottaa toisistaan *in vivo* -lämpökäsittelyt ja *in vitro* korkean lämpötilan käsittelyt. *In vivo* -lämpökäsittelyissä käytetään 30–40 °C:n lämpötilaa ja *in vitro* korkean lämpötilan käsittelyjä käytetään määrittämään lämpötilaa, jossa virus inaktivoituu. Viruksen inaktivoitumislämpötila on se lämpötila, jossa virus varsinaisesti kuolee kasvin mehussa. Inaktivoitumislämpötila voi vaihdella 40 °C:n ja 90 °C:n välillä. *In vivo* -lämpökäsittelyssä lämpötila on siis huomattavasti alhaisempi kuin useimpien virusten inaktivoitumislämpötilat. (Walkey 1985, 263.)

Lämminvesikäsittelyssä käsitellään lepotilassa olevia kasveja tai kasvin osia. Siemeniä, mukuloita, sipuleita ja puuvartisista pistokkaita käsitellään kuumalla vedellä 35–54 °C:ssa muutamia minuutteja tai tunteja. (Valkonen ym. 2005, 137.)

Käsiteltäessä kasvin osia, kuten istukkaita, sipuleita tai mukuloita, ne usein laitetaan kuumaan veteen tai kuumaan ilmaan, 50–52 °C:seen, 10–30 minuuttia pitkissä jaksoissa. Vaikka käsittelyssä alkuperäinen silmun kasvu saattaa hiukan heikentyä, voidaan kuitenkin saada aikaan viruksettomia versoja ja edelleen kasveja. Lämpökäsittely ei tuhoa viruksia latenttivaiheessa olevista siemenistä, vaan on tehokkainta aktiivisesti kasvavalle vegetatiiviselle kasvimateriaalille. (George 1993, 149.)

#### 4.4 Kemoterapia

Kemoterapiassa pyrkimyksenä on puhdistaa infektoitunut kasvi viruksista kemikaalien avulla. Vaikka monet kemikaalit pystyvät vaimentamaan virusoireita tai viruksen monistumista, harvat tuhoavat virusta kokonaan. Lisäksi monet viruksia ehkäisevät yhdisteet eivät ole soveltuneet käytettäväksi viljelykasveille niiden kustannuksien ja fytotoksisuuden (kasveille myrkyllisyyden) vuoksi. (Walkey 1985, 275.)

On esitetty, että kasvua edistävät kemikaalit, kuten sytokiniinit, hävittäisivät viruksen karkimeristeemiviljelyn aikana ja korkea sytokiniinikonsentraatio stimuloi isäntäkasvin proteiinisynteesiä viruksen proteiinisynteesin sijaan. Tälle teorialle on kuitenkin vain vähän kokeellisia todisteita. On kuitenkin mahdollista, että vaikka kasvua edistävät kemikaalit eivät suoraan inaktivoi virusta, ne saattavat kuitenkin stimuloida isäntäkasvin resistanssia. Tämä voi joissakin olosuhteissa johtaa viruksen häviämiseen. (Walkey 1985, 275–276.)

Toiset kemoterapeuttiset tutkimukset esittävät, että lupaavampi menetelmä voisi olla antimetaboliitin kemikaalin, kuten ribavirin (1,2,4,-triazole-3-carboxamide eli Virazole) yhdistäminen solukkoviljelyaineeseen. Nämä kemikaalit yhdessä lämpökäsittelyn kanssa käytettynä estävät viruksen replikaation infektoituneissa soluissa. Kun oletettavasti virussynteesi on pysähtynyt, kasvissa olevan viruksen heikentyminen jatkuu, kunnes viruksen häviäminen on tapahtunut. Näiden kemikaalien hinta ja mahdolliset phytotoksiset vaikutukset estävät niiden käytön pelto-olosuhteissa, mutta niiden käyttö laboratoriossa yhdistettynä karkimeristeemiviljelyn kanssa voi osoittautua hyödylliseksi joidenkin virusten

tuhoamisessa. Georger (1993, 151) mukaan ribavirin on tuloksellisin viruksia ehkäisevä (antiviral) aine solukkoviljelyssä käytettynä, muttei tarpeeksi tehokas käytettäväksi muiden viruksia hävittävien menetelmien tilalla. Myös toista viruksia ehkäisevää kemikaalia, adenine arabinoside (Vira-A, vidarabine), joka on alun perin kehitetty lääketieteelliseen tarkoitukseen, on käytetty tehostamaan virusten hävittämistä infektoituneista kärkimeristeemeistä, joita kasvatetaan solukkoviljelyssä. (Walkey 1985, 276.)

#### **4.5 Kryoterapia**

Menetelmänä kryoterapia perustuu kasvien kryosäilytystekniikkaan.

Kryosäilytyksessä kasvisolukkoja säilytetään -196 °C:ssa nestetypessä. (Bajaj & Reinert 1977, 757–777.) Kryoterapian avulla voidaan kasveista poistaa useita taudinaiheuttajia, kuten viruksia, fytoplasmoja ja bakteereja. Kryosäilytysmenetelmiä on kehitetty useille kasvilajeille ja monille kasvilajeille menetelmiä on sovellettu myös kryoterapiana taudinaiheuttajien poistamiseksi. (Wang, Panis, Engelmann, Lambardi & Valkonen 2008, 351.) Myös valkosipulille on kehitetty kryosäilytysmenetelmä (Keller 2002, 37–47). Toistaiseksi kryoterapiaa ei ole sovellettu valkosipulille kasvitaudinaiheuttajien poistamisessa.

## 5 TESTAUSMENETELMÄT

### 5.1 Taudinaiheuttajan kartoitus

Kasvitautilien ja taudinaiheuttajien diagnostiikka eli tunnistaminen käsittää kasvissa havaittujen oireiden määrittelyn ja oireiden aiheuttajan tunnistamisen. Usein on tarpeellista suorittaa kokeita kontrolloiduissa oloissa kasvihuoneessa tai laboratoriossa, jotta taudinaiheuttajan määrittäminen voidaan varmistaa. Kokeissa voidaan testata, aiheuttaako sairaasta kasvista eristetty mikrobi oireita terveessä kasvilla. Taudin ja taudinaiheuttajan tunnistamisen vaatiessa tarkempaa tutkimista on kerättävä näytteitä. Näytteeksi voidaan kerätä kokonainen kasvi tai kasvinosa, joka oirehtii. Myös oireiden valokuvaaminen on kannattavaa. Näyte on syytä pakastaa, jos taudinaiheuttajaa ei pystytä luokittelemaan edes alustavasti tai taudinaiheuttaja on todennäköisesti virus tai bakteeri. (Valkonen ym. 2005, 82.)

Joskus taudinaiheuttajan tunnistamista varten mikrobi täytyy kasvattaa kasvinäytteestä, esim. lehdenpalasta, puhtasviljelmäksi. Viruspuhtasviljelmä on mahdollista tuottaa hankaamalla sairaan kasvin mehua testikasvin lehteen, jolloin siirrostetaan virus testikasviin. Virus voidaan siirrostaa myös yksittäisen kirvan välityksellä testikasviin. Seuraavaksi yhdestä tartutetun lehden laikusta siirrostetaan virus uuteen testikasviin. Todennäköisesti laikku on yksittäisen virushiukkasen yhdessä solussa aiheuttaman tartunnan seurausta, näin ollen saadaan aikaan virusviljelmä, joka on perimältään yhtenäinen. (Valkonen ym. 2005, 83.)

Virusten tunnistuksessa keskeisiä ovat vasta-aineisiin ja testikasvikokeisiin perustuvat menetelmät. Lisäksi virushiukkasia voidaan havainnoida elektronimikroskoopilla. Useat vasta-ainetunnisteiset menetelmät ja DNA-tekniikat, joita käytetään kasvitauteja aiheuttavien mikrobien tutkimiseen ja diagnostiikkaan, ovat samoja kuin lääketieteessä käytetyt. (Valkonen ym. 2005, 85, 93.)

## 5.2 ELISA-testaus

### 5.2.1 ELISA-testin periaate

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) on tavallisin vasta-ainetunnisteisista testeistä (Valkonen ym. 2005, 88). Entsyymien kovalenttinen kiinnitys vasta-ainemolekyyleihin tekee ELISA-menetelmästä sekä todella tarkan että todella herkän menetelmän. ELISA-menetelmässä käytetään vasta-aineita, joihin on liitetty entsyymejä, niin että entsyymien katalyyttiset ominaisuudet ja vasta-aineen spesifisyys säilyvät entisellään. Tyypillisiä entsyymeitä, joita käytetään ovat peroksidaasit, alkaaliset fosfataasit ja  $\beta$ -galaktosidaasit. Kaikki nämä entsyymit katalysoivat reaktioita, jotka tuottavat värillisiä tuotteita, jotka voidaan havaita pieninäkin pitoisuuksina spektrofotometrin avulla. (Madigan & Martinko 2006, 804.)

Yksinkertaisimmassa ELISA-testissä tutkittava näyte kiinnitetään kiinteään alustaan. Alusta voi olla muovista valmistettu ELISA-kololevy tai proteiineja sitova nitroselluloosakalvo. Näytteen kiinnityksen jälkeen testiin lisätään vasta-ainetta, johon on kytketty entsyymi. Mikäli vasta-aine sitoutuu levyllä olevaan näytteeseen (esim. viruksen kuoriproteiini), saadaan sitoutuminen havaittua lisäämällä testiin ainetta, jota vasta-aineeseen kiinnitetty entsyymi hajottaa. Entsyymien toiminnan tuloksena ELISA-levyn kolossa tai nitroselluloosakalvon näytetäplän kohdalla kehittyy tunnusomainen väri. Käytettäessä ELISA-levyä voidaan värin voimakkuus mitata erityisellä lukulaitteella. Vasta-aineeseen voidaan kytkeä myös entsyymien sijasta tietyn aallonpituuden omaavaa valoa lähettävä fluoresoiva leima-aine. Fluoresoiva leima voidaan havaita sellaisenaan tai rajaamalla näytekentästä tuleva muu valo pois suotimien avulla, jolloin näytteen tarkasteluun tarvitaan apulaite, useimmiten mikroskooppi. ELISA-testiä voidaan käyttää myös tutkittavan aineen pitoisuuden määrittämiseen. ELISA-testistä on lukuisia muunnoksia. (Valkonen ym. 2005, 88.)

Kaksi perus-ELISA-menetelmää on kehitetty. Toinen menetelmä tunnistaa antigeenin (suora ELISA) ja toinen vasta-aineen (epäsuora ELISA). (Madigan & Martinko 2006, 804.)

### 5.2.2 DAS-ELISA

DAS-ELISA (double antibody sandwich ELISA) on suora ELISA-menetelmä. Menetelmä on erittäin spesifinen vain sille viruskannalle, jota vastaan vasta-aine on valmistettu. Testi saattaa tunnistaa saman viruksen eri kantoja, mutta vain heikosti. Kuitenkin, jos tarkoituksena on tuottaa terveitä kasveja, pitää kaikki virukset lajista riippumatta havaita. Tällöin epäsuora ELISA-testi on sopivin, koska se tunnistaa myös viruskannat, jotka ovat samankaltaisia kuin kanta, jolle vasta-aine on valmistettu. (George 1993, 153.)

DAS-ELISA-testissä testattavalle virukselle spesifinen vasta-aine lisätään ensin testilevyn (polystyreenitestilevy) koloihin, ja vasta-aine kiinnittyy levyn pintaan. Seuraavaksi koloihin lisätään näyte, jolloin näytteen viruspartikkelit kiinnittyvät vasta-aineeseen kolossa. Näytteen lisäämisen jälkeen lisätään lisää vasta-ainetta, johon tällä kertaa on liitetty entsyymi (alkalinen fosfataasi). Entsyymillä leimattu vasta-aine kiinnittyy aikaisemmin sitoutuneeseen virukseen, jolloin viruksen ympärille syntyy kuin "voileipä" vasta-aineista (double antibody sandwich). Kiinnittyneen virus-vasta-ainekompleksin olemassaolo ja määrä havaitaan lisäämällä koloihin substraattia, joka entsyymien toimesta muuttaa väriään. Tulos voidaan analysoida kolorimetrillä tai fluorometrin avulla. Levyt pestään jokaisen vaiheen välissä. (George 1993, 154.)

### 5.2.3 TAS-ELISA

TAS-ELISA (triple antibody sandwich ELISA) on epäsuora ELISA-menetelmä. TAS-ELISA-testissä ensimmäinen vasta-aine kiinnitetään mikrotiitterilevyn pintaan. Tutkittava näyte lisätään levyille, jolloin antigeeni kiinnittyy vasta-aineeseen. Antigeenilla tarkoitetaan tässä virusta. Yleisesti antigeeni voi olla esim. vieras solu, virus tai proteiini ja se sitoutuu spesifisesti vasta-aineeseen (Tirri, Lehtonen, Lemmetyinen, Pihakaski & Portin 2001, 55). Seuraavaksi levyille lisätään toinen vasta-aine, joka tunnistaa antigeenin. Tämän jälkeen lisätään entsyymillä leimattu vasta-aine, joka tunnistaa antigeeniin sitoutuneen vasta-aineen. Lopuksi lisättävä substraatti sitoutuu entsyymiin. Positiivinen tulos havaitaan testissä substraatin ja entsyymien tuottaman värireaktion avulla. (Immunoassay Wikipedia ELISA n.d.)

### 5.3 Mehutestaus

Virusten siirrostaminen infektoituneista kasveista terveisiin kasveihin on tärkeä menetelmä tutkittaessa virustauteja. Laboratoriossa siirrostaminen tavallisesti toteutetaan jauhamalla sairaan kasvin (testattava kasvi) lehteä ja hankaamalla saatua mehua terveen kasvin (testikasvi) lehteen. Menetelmää kutsutaan mehusiirrostukseksi. Mehusiirrostuksella testataan kasvimehun välityksellä leviävien virusten esiintymistä kasvissa. Laboratoriossa mehusiirrostusta käytetään virusten eristämiseen sairaista kasveista, virusten siirtämiseen testikasveihin, tutkittaessa virusoireita eri testikasveilla sekä tutkittaessa viruksen infektiivisyyttä. (Walkey 1985, 93.)

Jotta testikasvin infektio tapahtuisi, viruksen pitää päästä testikasvin solukkoon haavan kautta. Ilman testikasvin solukossa olevaa vauriota virus ei kykene läpäisemään kutikulaa, eikä silloin pysty pääsemään kutikulan alla olevien solujen sisään. Mehusiirrostuksessa vaurio testikasvin pintaan aiheutetaan tavallisesti käyttämällä mietoa hankausjauhetta, joka vahingoittaa testikasvin pintaa samalla kun sairaan kasvin mehua hangataan testikasvin lehden pinnalle. Virus pääsee testikasvin lehden soluihin hankausjauheen aiheuttamien haavojen kautta. Hankausjauheen tulee olla niin hienoa, että se aiheuttaa ainoastaan pieniä haavoja solukkoon. Jauheen aiheuttamat haavat eivät saa olla niin vakavia, että vaurioitettut solut kuolisivat. Luonnossa viruksilla on monta tapaa kulkeutua isäntäkasviinsa (esim. kirvojen välityksellä). (Walkey 1985, 93, 97.)

Mehusiirrostusta varten tarvittava mehu voidaan hankkia monesta kohtaa sairasta kasvia. Yleensä kuitenkin kasvin nuoremmat lehtiosat sisältävät enemmän virusta kuin vanhemmat puumaiset solukot. Usein valitaan lehdet, joissa näkyy virusoireita. Infektoitunut lehti tai muu kasvisolukko jauhetaan, jotta siitä saadaan siirrostettava mehu. Jauhaessa kasvisolukosta vapautuu viruksen lisäksi mehuun erilaisia isäntäkasvin aineenvaihdunnan tuotteita ja jätteitä kasvisolukosta. Jotkut näistä yhdisteistä voivat inaktivoida viruksia tai estää viruksen infektiivisyyden. Tämän takia kasviaines jauhetaan sopivassa puskuriliuoksessa ja matalassa lämpötilassa (0 °C), jotta virukset eivät menettäisi infektiivisyyttään. (Walkey 1985, 93–95.)

Laboratoriossa testikasveina käytetään usein *Nicotiana spp.*, *Chenopodium spp.* ja *Phaseolus vulgaris* -lajeja, koska niiden on havaittu olevan alttiita useiden



kasvivirusten aiheuttamille infektioidille. Täten ne ovat hyviä isäntäkasveja virusviljelmien ylläpitoon ja virusten lisäykseen. (Walkey 1985, 97.)

Testikasvin infektio tapahtuu ainoastaan, jos virus pystyy monistumaan testikasvin epidermaalin soluissa. Jos infektio onnistuu, virus monistuu ja leviää muihin soluihin. Paikallisia oireita saattaa muodostua. Tämän jälkeen virus saattaa levitä kasvin johtosolukkoon ja sitä kautta joka puolelle kasvia. (Walkey 1985, 98.)

Useimmissa testikasveissa lehdet ovat eniten alttiita ja sopivimpia kohtia siirrostaa virus testikasviin. Joillakin lajeilla (esim. *Phaseolus vulgaris*) kasvin ensimmäiset lehdet ovat alttiimpia tartunnalle, kuin myöhemmin kehittyvät lehdet. *Cucurbitaceae*-heimon lajilla taimen sirkkalehdet ovat alttiimpia virukselle kuin muut lehdet ja joskus juuret voivat olla kaikkein sopivin osa kasvista siirrostukseen. (Walkey 1985, 99.)

Siirrostuksessa käytettävän testikasvin valinta riippuu paljon siitä mikä on siirrostetta virus, sekä siitä mihin siirrostuksella pyritään. Usein tarvitaan eri lajien testikasveja tutkittaessa samaa virusta. Yhtä testikasvilajia voidaan käyttää pitkäaikaisessa viruksen lisäämisessä, toinen testikasvilaji saattaa soveltua viruksen nopeaan lisäämiseen ja puhdistukseen, kolmas testikasvilaji viruksen aiheuttamien paikallisten vioitusten analysointiin ja edelleen tietyt testikasvit viruksen aiheuttamien oireiden tutkimiseen diagnostisiin tarkoituksiin. Toisissa tapauksissa viruksella voi olla hyvin vähän isäntäkasveja, ja tartunta voi rajoittua kasvi heimoon tai sukuun. (Walkey 1985, 99–100.)

Testikasvia valitessa on kiinnitettävä huomiota myös valittavan kasvin lajikkeeseen. Kasvilajin tietty lajike voi olla virukselle hyvin altis, kun taas toinen lajike voi olla samalle virukselle vastustuskykyinen. Vaikka valittu testikasvi on altis siirrostettavalle virukselle, monet tekijät vaikuttavat infektion asteeseen ja laajuuteen. Mekaaniseen siirrostukseen vaikuttavat lämpötila, valon intensiteetti, testikasvin ravinnetilanne ja testikasvin ikä. Tärkeä siirrostukseen vaikuttava tekijä on testikasvin fysiologinen tila siirrostuksen tapahtuessa. Esimerkiksi testikasvien pitäminen pimeässä ennen siirrostamista tekee niistä alttiimpia virustartunnalle, myös hyvin kastellut testikasvit ovat alttiimpia tartunnalle kuin vähemmän kastellut. Siirrostuksen jälkeen tehtävät käsittelyt saattavat myös lisätä viruksen infektiivisyyttä. Esimerkiksi monissa laboratorioissa siirrostettuja testikasvin lehtiä huuhdellaan heti siirrostuksen jälkeen kylmällä vedellä. Tämän käsittelyn tehokkuus on vahvistettu monilla, muttei kaikilla viruksilla. (Walkey 1985, 100–101.)

Siirrostuksessa on eri menetelmiä. Siirrostus voidaan tehdä esimerkiksi sormin hankaamalla testikasvin lehden pintaa tai vanupuikolla hankaamalla. Siirrostus on saatu tehtyä myös suihkuttamalla siirrostettavaa mehua, johon on lisätty hankausjauhetta, testikasvin lehdille. (Walkey 1985, 97.)

Testikasveihin ilmestyvät oireet voivat olla paikallisia tai systeemisiä. Paikalliset oireet voivat kehittyä 3 päivän aikana tai niiden kehittymiseen voi mennä enemmän aikaa riippuen siitä mikä kasvi ja mikä virus on kyseessä. Paikalliset oireet ilmestyvät lehdessä siihen kohtaan, josta virus on päässyt kasvin sisään. Paikalliset oireet ilmenevät kloroottisina tai nekroottisina pilkkuina tai rengaspilkkuna. Systeemisiä oireita kehittyy silloin, kun virus on levinnyt kauttaaltaan kasviin. Systeemiset oireet voivat ilmestyä paikallisten oireiden kehittymisen jälkeen. Systeemiset oireet voivat ilmentyä vaihtelevilla tavoilla, kuten kääpiökasvuisuutena, mosaiikkina, kloroosina, nekroosina tai lehtien kurtistumisena. Useita näistä oireista saattaa esiintyä samassa kasvissa. (Burns 2009, 10.)

## 5.4 PCR-menetelmä

Polymeraasiketjureaktio eli PCR on menetelmä, jolla tiettyä DNA-jaksoa voidaan monistaa. Reaktiossa templaattina toimiva kaksijuosteinen DNA denaturoidaan eli sen kierre aukeaa ja juosteet erkanevat toisistaan. Yksittäisiin juosteisiin pariutuvat lyhyet alukkeet, joissa on komplementaarinen sekvenssi sen templaatin kohdan kanssa, josta monistusreaktion halutaan alkavan. DNA-polymeraasi entsyymi monistaa alukkeiden väliin jäävän alueen ja templaatin molemmille juosteille rakentuvat vastinjuosteet. Synteesin jälkeen suoritetaan uusi denaturaatio, jolloin templaatti-DNA monistuu jälleen. Moneen kertaan toistettuna sykli tuottaa runsaasti haluttua DNA-jaksoa. (Campbell & Reece 2002, 382–383.)

PCR:lla monistunut DNA-jakso voidaan havaita elektroforeesin avulla. Siinä reaktioseosta ajetaan geelissä sähkövirran avulla, jonka jälkeen DNA-värjättyä geeliä tarkastellaan ultraviolettivalossa. PCR-menetelmää voidaan soveltaa myös tunnistettaessa viruksia. Kuitenkin jos viruksen perintöaines on RNA:ta, RNA täytyy ensin kopioida DNA:ksi käänteiskopioijaentsyymien avulla. (Valkonen ym. 2005, 93.)

PCR on tunnistusmenetelmänä nopea ja erittäin herkkä. Menetelmän avulla voidaan ainakin teoriassa havaita yksikin virushiukkanen tai bakteeri- tai sienisolun PCR:n avulla voidaan mikrobi tunnistaa esim. kasvin juuresta tai lehdestä eristetystä nukleiinihaponäytteestä ilman, että mikrobia tarvitsee puhdasviljellä. (Valkonen ym. 2005, 93.)

## 6 VALKOSIPULIN LISÄYS

### 6.1 Lisäys avomaalla

Yleensä valkosipulia lisätään kynsistä eli tytärsipuleista. Valkosipulia voidaan lisätä myös itusilmuista, joita jotkin lajit tuottavat kukkavarren päähän. Lisättäessä itusilmuista normaalikokoisen kerrannaissipulin kasvattaminen kestää kaksi kasvukautta. Valkosipuli ei tuota siemeniä. (Ahokas ym. 2006, 23–24.)

Valkosipuli istutetaan varhain keväällä sen pitkän kasvuaikavaatimuksen takia. Etelä-Suomessa valkosipulit tulee istuttaa huhtikuun lopusta toukokuun alkuun ja Pohjois-Suomessa toukokuun loppuun mennessä. Kasvin lehtien kasvu alkaa hitaana jo 0 °C:ssa, eikä kasvi ole kylmänarka. Kynnet, joita käytetään istukkaina, irrotetaan emosipulista vasta vähän ennen istutusta. Jos kynnet ovat pienikokoisia, sadosta tulee pienempi kuin istutettaessa suuria kynsiä. Alle gramman painoisista istukkaista ei yleensä kehity jakautunutta sipulia yhden kasvukauden aikana. Esikasvatuksesta ei ole havaittu suurta hyötyä, koska taimien istutus aiheuttaa kasville stressiä. Käytettäessä esikasvatusta, 1–2 viikkoa on riittävä aika. Kynsien istutussyvyys on 5–8 cm. Jotkut valkosipulikannat soveltuvat myös istutettaviksi syksyllä. Sopiva kasvutiheys valkosipulille on 20–40 tainta neliömetrillä. (Ahokas ym. 2006, 23–24.)

Valkosipuli hyötyy kylmäkäsittelystä, sillä kylmäkäsittelyllä voidaan lyhentää kaikkia valkosipulin kehitysvaiheita. Kylmäkäsittelyssä sipuleita pidetään maaliskuussa kuukauden verran jääkaappilämpötilassa. Huhtikuun puoliväliin mennessä sipulit istutetaan juurtumaan astiaan, jossa on kosteaa hiekkaa tai turvetta. Juurtuneet kynnet

erotellaan toisistaan ja istutetaan edelleen maahan. Ammattiviljelijät eivät juurikaan käytä kylmäkäsittelyä ja esikasvatusta, koska työmäärä lisääntyy. Kannattavinta on valkosipulin kynsien istutus syksyllä. Tällöin kynnet saavat kylmäkäsittelyn ulkona ja aloittavat kasvun keväällä sopivaan aikaan riittävän viileässä. Syksyllä istutettaessa kynnet erotellaan ja istutetaan juurtumattomina, jolloin vältetään juurien vaurioitumiselta kynsiä irrotettaessa. Valkosipulien keskimmäisiä pieniä kynsiä ei kannata istuttaa, koska niistä kasvaa vain jakaantumattomia pikkusipuleita. (Valkosipuli n.d.)

Valkosipuli vaatii runsaasti ravinteita, tärkeimpinä fosfori ja kalium. Valkosipulin typen tarve on suurempi kuin ruokasipulilla, joten lisälannoitusta on annettava 1–2 kertaa kesän aikana. Koska valkosipulin juuristo on matala, se kärsii helposti kuivuudesta ja kastelusta tulee huolehtia etenkin touko-heinäkuussa. (Ahokas ym. 2006, 24.)

## **6.2 Mikrolisäys**

### **6.2.1 Mikrolisäyksen periaate**

Mikrolisäys on kasvin lisäämistä kasvinosista, useimmiten silmun meristeemistä, suuremmasta silmun osasta tai versonkärjestä. Mikrolisäyksen avulla emokasvin ominaisuudet saadaan siirrettyä muuttumattomina tuotettuihin uusiin kasviyksilöihin. Uudet kasviyksilöt ovat kaikki perimältään toistensa kaltaisia. Mikrolisäystä kutsutaan täten myös kasvien kloonaukseksi. (Haapala & Niskanen 1992, 22.)

Kasvien mikrolisääminen solukkoviljelyllä on vaihtoehto perinteiselle vegetatiiviselle lisäämiselle. Perinteistä vegetatiivista lisäämistä ovat varttaminen ja pistokaslisäys. Näistä mikrolisääminen eroaa ainoastaan käytetyn kasvinosan koon ja aseptisen työskentelytavan takia. Meristeemi-, silmu- ja versonkärkilisäys ovat käytännössä aseptista mikropistokaslisäystä. (Haapala & Niskanen 1992, 22.)

Solukkoviljelyssä viljellään yksittäisiä soluja, protoplasteja, erilaistumatonta kallussolukkoa tai erilaistuneita solukoita. Mikrolisättyjä kasveja voidaan tuottaa kaikista solukkoviljelyn lajeista. (Haapala & Niskanen 1992, 15.)

Jos viljely aloitetaan kasvin vegetatiivisesta (kasvullisesta) solukosta, saadaan tuotettua täsmälleen samanlaisia kasveja perimältään kuin emokasvi ja voidaankin puhua kasvien kloonamisesta. Jos taas viljely aloitetaan generatiivisista soluista (lisääntymissoluista), tuotettavat kasvit poikkeavat perimältään emokasvista. Kasvissa generatiivisia osia ovat siitepölyhiukkaset. Kasvin muut osat ovat vegetatiivista solukkoa. (Haapala & Niskanen 1992, 15.)

Erilaisia mikroviljelmiä ovat meristeemiviljelmät, versonkärki- ja silmuviljelmät, kallusviljelmät, solu- ja suspensioviljelmät, protoplastiviljelmät, hede- ja siitepölyviljelmät, alkioviljelmät sekä mikrovarttaminen. (Haapala & Niskanen 1992, 15–21.)

### **6.2.2 Meristeemiviljelmä**

Meristeemi on kasvin erilaistumatonta kasvusolukkoa. Se ei ole vielä erilaistunut miksikään kasvinosaksi. Kaikissa kasvavissa kasvinosissa on meristeemisolukkoa, mutta helpointa aloittaa sen viljely on silmun meristeemistä. Silmun meristeemi sijaitsee silmun kasvupisteessä, joka on silmun sisällä lehdenaiheiden suojassa. (Haapala & Niskanen 1992, 15.)

Meristeemialoitus on paras solukkolisäyksen aloitusmenetelmä mikrolisättäessä kestäviä puuvartisia kasveja. Muuntelua ei tavata juuri ollenkaan meristeemiviljelmissä, vaan niitä pidetään melko stabiileina. Tämän lisäksi meristeemisolukot ovat vaivattomia ja nopeita käsitellä. (Haapala & Niskanen 1992, 15.)

Valkosipulia voidaan lisätä meristeemiviljelyn avulla. Lähes kaikki valkosipulin genotyypit ovat suvullisesti steriilejä ja niitä lisätään normaalisti vegetatiivisesti kynsistä ja sipuleista. Tämän seurauksena kaupalliset valkosipuli lajikkeet ovat alttiita infektoitumaan viruksilla. Käytettäessä solukkoviljelyä lisäämismenetelmänä, etuna on se, että on mahdollista tuottaa ja säilyttää virusvapaita kantoja. Useat tutkimukset kuvaavat miten meristeemikärkiviljelyä on käytetty onnistuneesti virustautien poistamiseen valkosipulista ja näin parannettu sadon laatua. (George 1993/1996, 1187.)

### 6.2.3 Versonkärkiviljelmä

Versonkärkiviljelmä aloitetaan, kuten meristeemiviljelykin, kasvin silmusta. Aloituksena otetaan kuitenkin joko koko silmu tai vielä suurempi kappale, jossa voi olla jopa 1 cm vartta ja siinä yksi tai muutama silmu. Aloituskappale asetetaan kasvatusalustalle joko pysty- tai vaaka-asentoon siten, että silmut saadaan lähelle kasvatusalustaa. Silmuista alkaa kasvaa versoja, jotka alkavat pidentyä noin kolmen viikon kuluessa. Kun versot ovat 1,5–2 cm mittaisia ne katkotaan niin, että 1–3 silmua jää taas jokaiseen palaan. Silmuista kehittyy taas versoja, jotka siirretään jälleen monistumaan tai juurrutusalustalle juurtumaan. (Haapala & Niskanen 1992, 18.) Valkosipulilla versonkärkiviljelmät ovat käytännöllisiä, kun halutaan lisätä nopeasti kantaa, jonka virukset on selvitetty (George 1993/1996, 1187).

### 6.2.4 Kallusviljelmä

Kallusviljelmiä ei pidetä suositeltavina kasvien kloonauksessa, sillä kallussolukko on erilaistumatonta solukkoa, jossa somaklonaalisen muuntelun mahdollisuus on suurempi kuin erilaistuneessa solukossa (Haapala & Niskanen 1992, 18). Kallussolukossa voi tapahtua kromosomihäiriöitä, jolloin kallussolukosta erilaistuneet kasvit saattavat poiketa alkuperäisestä kasvista suurestikin (Bremer 1983, 5). Jonkin verran kallusta kasvaa aina aloituspaikan leikkauspintaan ja siitä erilaistuu versoja adventiivisilmujen kautta. Runsaaseen kallussolukon kasvuun pyritään vain somaattisen embryogeneesin avulla tuotettujen kasvien viljelmissä. Somaattista embryogeneesiä edeltävä kallusviljelmä voi olla peräisin kasvullisesta solukosta, joka on voitu ottaa periaatteessa mistä tahansa kasvin osasta. Kallusviljelyn edetessä kallusta kasvatetaan ja sen soluista alkaa kehittyä alkiota muistuttavia rakenteita. Näistä kasvullisista alkioista kehittyy edelleen versoja, joita voidaan lisätä ja siirtää ne kasvihuoneoloihin. (Haapala & Niskanen 1992, 18.)

Valkosipulilla kallusviljelmistä, jotka on saatu aikaan lehtien ja verson kärkien paloista, on saatu kehitettyä kasveja MS-alustalla. Jotkin kallusviljelmien avulla kasvatetut valkosipulit, on havaittu geneettisesti epänormaaleiksi. Kun suvullista rekombinaatiota (uusien geeniyhdistelmien syntymistä) ei tapahdu lajilla, voi olla

mahdollista hyödyntää tällaista muuntelua valittaessa parempia genotyypppejä. (George 1993/1996, 1187.)

### 6.2.5 Varsikiekkomenetelmä

Menetelmä perustuu valkosipulin kynnen kehittymättömässä kannassa olevaan rajattuun osaan, jota kutsutaan varsikiekoksi ja joka on osoittautunut todella potentiaalisesti mikrolisäyksen aloitusmateriaaliksi. Menetelmän avulla 20–30 solukkoviljeltyä versoja on saatu erilaistumaan yhdestä kynnestä yhden kuukauden viljelyn aikana, alustana kasvihormoniton Linsmaier Skoog (Linsmaier & Skoog 1965, 100–127) ravinnealusta. Enemmän kuin 90 % versoista muodostivat sipulin alkuja yhden kuukauden lisäviljelyn aikana *in vitro* viljelyssä. Esikäsittelynä valkosipuleita oli pidetty 4 °C lämpötilassa noin kahdeksan viikkoa, ennen kuin niistä leikattiin varsikiekot. Esikäsittely edisti sekä version kehitystä että sipulin alkujen muodostumista. Tämä uusi valkosipulin lisäysmenetelmä on nimetty varsikiekkomenetelmäksi (engl. the stem-disc culture method). Useiden kenttäkokeiden tulokset osoittivat, että varsikiekkomenetelmä on käyttökelpoinen valkosipulilla, tuotettaessa istukassipuleita sekä viruksettomia sipuleita. Lisäksi se on uudenlainen viljelymenetelmä valkosipulille, kun valkosipulin viljelyyn käytetään kynsien sijasta *in vitro* -viljelyllä aikaansaatuja sipuleita. (Ayabe & Sumi 1998, 773.)

## 7 VALKOSIPULIAINEISTO

Opinnäytetyön valkosipulianeistona oli suomalaisen viljelijän kanta, jota viljelijä viljeli menestyksellä, kunnes kanta alkoi taantua virustartuntojen vuoksi. Alun perin kanta on tuotu Suomeen Kanariansaarilta. (Laamanen 2010.)

Valkosipulikannan taantuminen sai alkunsa, kun 2000-luvun alussa kirvoja esiintyi paljon kasveissa ja myös sipuleissa. Kirvojen runsas esiintyminen todennäköisesti aiheutti virusten leviämistä valkosipulikantaan. (Laamanen 2010.) Työssä testattavista viruksista kirvovälitteisiä ovat OYDV, SLV, GarCLV, LYSV ja SYSV. Kirvojen

siirtämät virukset saattavat olla peräisin esimerkiksi läheisillä alueilla mahdollisesti viljeltävistä ryvässipuleista. Virustartunnat johtivat valkosipulikannan taantumiseen, ja viljelijä lopetti lopulta kannan viljelyn kokonaan. Vuoden 2009 alussa viljelijä lähetti virussaastuneen valkosipulikannan lepotilaisia sipuleita (ks. kuvio 2) MTT-Laukaan toimipisteeseen viruspuhdistusta varten.

Työn tavoitteena oli lämpökäsitellyllä puhdistetun valkosipulikannan puhtauden testaus sekä viruspuhtaan valkosipulimateriaalin lisäys. Työlle oli tarve, sillä viljelijä halusi saada valkosipulikannan viruksettomia sipuleita, jotta voisi taas aloittaa uudelleen kannan viljelyn. Valkosipulilajike on suurikokoinen ja maukas, joten sen viljely on kannattavaa.



KUVIO 2. Lepotilaisia valkosipuleita, joita viljelijä lähetti MTT:lle



## **8 AINEISTON PUHDISTUS JA TERVEYDEN TESTAUS**

### **8.1 Lämminilmakäsittely**

Valkosipuliaiaineiston puhdistus suoritettiin lämminilmakäsittelyllä yhdistettynä meristeemialoituksiin. Lämminilmakäsittely tehtiin lepotilaisten valkosipulien kynsille kahdessa erässä. Ensimmäisen kynsierän lämpökäsittely aloitettiin 30.4.2009 ja toisen erän 22.7.2009. Lämminilmakäsittely tehtiin istuttamalla kynnet ruukkuihin, jotka laitettiin lämpökaappiin kasvamaan. Yhteen ruokkuun istutettiin aina yksi kynsi. Lämminilmakäsittelyn aikana kynnet lähtivät kasvamaan ja osa kynsistä alkoi jakaantua uusiksi kynsiksi. Kun valkosipulin kynnet olivat olleet tavoitelämpötilassa (+ 37 °C) riittävän ajan (21–30 vrk) niistä otettiin mikrolisäysaloitukset. Yhdestä kynnestä otettiin aina yksi aloitus, joten ruukuista, joissa kynnet olivat jakaantuneet, saatiin useampi aloitus. Aloitukset laitettiin kukin omaan mikroviljelypurkkiin kasvamaan. Aloituksille annettiin kasvupistenumerot juoksevassa järjestyksessä. Osa kynsistä kuoli lämpökäsittelyn aikana, joten kaikista niistä ei saatu aloituksia.

### **8.2 ELISA-testaus**

ELISA-testaus suoritettiin (ks. liite 2) valkosipuliaiaineiston mikroviljelmistä otetuille näytteille. Testaus suoritettiin neljässä erässä: ensimmäinen erä 10.–11.9.2009, toinen erä 3.12.2009, kolmas erä 17.3.2010 ja neljäs erä 24.11.2010. ELISA-testaus suoritettiin DAS- ja TAS-ELISAlla. Valkosipuliaiaineistosta testattiin valkosipulilla yleisimmin esiintyviä viruksia OYDV, SLV, GarCLV, LYSV, SYSV sekä valkosipulin virukset A-D (GarV-A, GarV-B, GarV-C ja GarV-D). DAS-ELISA-testillä testattavia viruksia olivat OYDV, GarCLV, LYSV sekä valkosipulin virukset A-D. TAS-ELISA-testillä testattavia viruksia olivat SLV ja SYSV. DAS-ELISA-testin vasta-aineet oli tilattu yrityksiltä Loewe Biochemica GmbH ja DSMZ. TAS-ELISA-testin vasta-aineet oli tilattu yritykseltä DSMZ. Testattavia kasvupisteitä oli yhteensä

32 kappaletta. Jos ELISA-testin tulos oli epävarma, testi uusittiin kyseisen viruksen kohdalla.

Ennen valkosipuliaineiston puhdistusta lämpökäsittelyllä, aineiston valkosipuleista oli otettu sekanäytteitä, jotka testattiin ELISA-testillä. Tarkoituksena selvittää ELISA-testin avulla, että valkosipuliaineisto oli virussaastunut ennen sen puhdistusta.

### 8.3 Mehutestaus

Mehutestauksella oli tarkoitus osoittaa, että valkosipuliaineisto oli virussaastunut ennen aineiston puhdistusta. Mehutestaus suoritettiin valkosipuliaineiston mikroviljelmistä otetuilla näytteillä, jotka olivat pakastettuja (ks. liite 1). Mehutestaus tehtiin kaksi kertaa. Ensimmäinen siirrostuspäivä oli 6.4.2010 ja toinen siirrostuspäivä 27.5.2010. Testikasveina mehutestauksessa olivat *Chenopodium quinoa* ja *Chenopodium amaranticolor*. Ensimmäisen siirrostuksen näytteet oli otettu 21.10.2009 ja toisen siirrostuksen 4.9.2009.

Ensimmäisessä mehutestauksessa siirrostettiin näytteitä; terve, sairas ja kontrolli. Terve näyte valmistettiin ELISA-testillä terveeksi todetusta kasvupisteestä. Sairas näyte valmistettiin ELISA-testillä virussaastuneeksi todetusta kasvupisteestä. Kontrollinäyte sisälsi ainoastaan näytepuskuria. Ensimmäisessä mehutestauksessa kutakin näytettä, terve, sairas ja kontrolli, siirrostettiin kolmeen *C. quinoa* ja kolmeen *C. amaranticolor* kasviin. Toisessa mehutestauksessa käytettiin ainoastaan näytettä sairas (ei kontrolli- ja terve-näytettä). Toisessa mehutestauksessa sairasta näytettä siirrostettiin kuuteen *C. quinoa* ja kuuteen *C. amaranticolor* kasviin. Testikasvien lehtiä havainnoitiin noin viikon välein (ks. kuvio 3). Testikasveista havainnoitiin paikallisia sekä systeemisiä oireita.



KUVIO 3. Siirrostetut testikasvit kasvihuoneella

## 9 AINEISTON LISÄYS

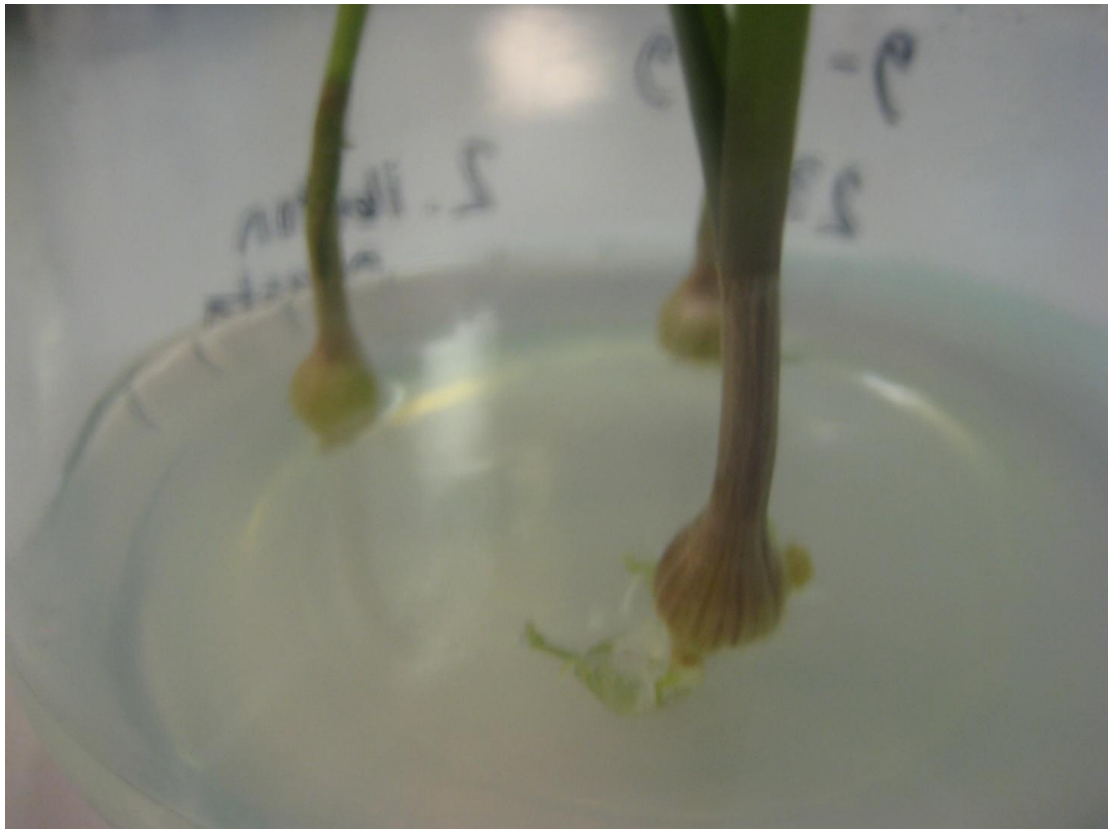
Lämpökäsittelyn jälkeen otettuja aloituksia mikrolisättiin ja niistä kasvoi pieniä sipuleita. Varsikiekkolisäykseen saakka lisääminen perustui aloituksista kasvaneiden sipulien jakaantumiseen, jolloin jakaantuneista sipuleista voitiin erotella uusia sipuleita mikrolisäyspurkkeihin.

### **Lisääminen varsikiekkojen avulla**

Ennen valkosipuliaineiston varsikiekkolisäystä menetelmää harjoiteltiin 23.2.2010 kahdella MTT:n mikroviljelmissä olleella valkosipulikannalla ('Heimala' ja lajikenimetön talvivalkosipulikanta). Ennen varsikiekkojen leikkausta sipulit olivat

olleet kolme vuorokautta jääkaapissa. Kokeiluna leikattiin varsikiekkomyös yhdestä varsinaisen valkosipuliaineiston sipulista.

Työn valkosipuliaineistoa (ks. kuvio 4) lisättiin varsikiekkomenetelmällä 30.3 ja 31.3.2010. Aineiston kaikista sipuleista ei leikattu varsikiekkoja. Ennen varsikiekkojen leikkaamista sipuleille annettiin kylmäkäsittely pitämällä niitä jääkaapissa noin 4 °C:ssa 39 vuorokautta. Jokaisesta lisättävästä sipulista leikattiin yksitellen yksi noin 1 mm:n paksuinen varsikiekkomyös. Varsikiekkomyös leikattiin mikroskoopin alla, yksi kasvupiste kerrallaan, laminaarivirtauskaapissa aseptisesti. Leikkaamalla saatu ympyrän muotoinen varsikiekkomyös jaettiin vielä mikroskoopin alla neljään osaan. Saadut palat asetettiin mikroviljelypurkkeihin hormonittomalle MS0-alustalle kehittymään.



KUVIO 4. Valkosipuliaineiston sipuleita mikroviljelypurkissa ennen varsikiekkomenetelmällä lisäämistä

MS0-alustalla kehittyviä paloja havainnoitiin kahden viikon välein.

Mikroviljelypurkkien lasin läpi havainnoitiin palojen väriä, turpoamista, versoamista sekä myöhemmin sipuleiden muodostumista. Havainnoitaessa paloja käytettiin koodeja Va (vaalea), Vi (vihreä), VaT (vaalea turvonnut) ja ViT (vihreä turvonnut). Versoamista havainnoitiin koodeilla + ja ++. Yksi plus-merkki annettiin paloille jos versoaminen oli alkanut ja kaksi plus-merkkiä jos verso oli kasvussa (yli kahden senttimetrin pituinen verso). Versoiksi havainnoitiin paloista lähtevät ns. teräväkärkiset kasvut. Kasvuja, joiden kärki oli tylppä ei havainnoitu versoiksi. Sipuleiden kehittymistä versoista havainnoitiin merkitsemällä ylös sipuleiden määrä. Havainnointikoodeja käytettiin aineiston välitulkinnoissa, eikä niitä huomioitu lopullisissa tuloksissa. Lopullisiin tuloksiin laskettiin vain syntyneiden sipulien määrät.

Kun varsikiekkolisäyksestä oli kulunut noin kaksi kuukautta, mikroviljelypurkeista karsittiin ylimääräisiä vihreitä kasvuja ja juuria pois, jotta sipulin alut saatiin laskettua. Ylimääräisten kasvujen karsiminen suoritettiin, kasvupiste kerrallaan, aseptisesti laminaarivirtauskaapissa.

## **10 TULOKSET**

### **10.1 ELISA-testaus**

Testattavia kasvupisteitä oli yhteensä 32 kappaletta, joista 25 kappaletta saatiin testattua kaikkien työn virusten osalta (ks. liite 3) Kaikista kasvupisteistä ei saatu lehtinäytteitä kevään 2011 aikana, joten niiden testaus on kesken. Kasvupiste luokiteltiin terveeksi, jos ELISA-testin tulos oli negatiivinen kaikille testatuille viruksille. Kasvupiste luokiteltiin sairaaksi, jos ELISA-testin tulos oli positiivinen yhdelle tai useammalle testattavalle virukselle. Testatuista kasvupisteistä 80 % oli terveitä ja 20 % sairaita.

Sairaista kasvupisteistä 20 % oli OYDV:n saastuttamia, 100 % LYSV:n saastuttamia ja 60 % SLV:n saastuttamia. Kaikissa testatuissa kasvupisteissä ELISA-testin tulos oli Valkosipulin virus A-D viruksille negatiivinen. ELISA-testin tulos oli negatiivinen virusten GarCLV ja SYSV osalta kaikissa testatuissa kasvupisteissä (ks. taulukko 1).

Ennen valkosipuliaineiston puhdistusta otettujen sekanäytteiden ELISA-testitulokset olivat vahvasti positiivisia virusten OYDV, LYSV, SLV ja GarV-B osalta.

TAULUKKO 1. ELISA-tulokset

Kasvu- piste	ELISA -testien tulokset									
	OYDV	LYSV	SLV	GarCLV	GarV-A	GarV-B	GarV-C	GarV-D	SYSV	
9-1547	-	-	-	-	-	-	-	-	-	terve
9-1548	-	-	-	-	-	-	-	-	-	terve
9-1553	-	+	+	-	-	-	-	-	-	sairas
9-1554	-	-	-	-	-	-	-	-	-	terve
9-1556	-	+	+	-	-	-	-	-	-	sairas
9-1557	+	+	+	-	-	-	-	-	-	sairas
9-1559	-	-	-	-	-	-	-	-	-	kuollut
9-1560	-	-	-	-	-	-	-	-	-	terve
9-1562	-	+	-	-	-	-	-	-	-	sairas
9-1564	-	-	-	-	-	-	-	-	-	kuollut
9-1565	-	-	-	-	-	-	-	-	-	terve
9-1923	-	-	-	-	-	-	-	-	-	terve
9-1924	-	-	-	-	-	-	-	-	-	terve
9-1926	-	+	-	-	-	-	-	-	-	sairas
9-1928	-	-	-	-	-	-	-	-	-	terve
9-1929	-	-	-	-	-	-	-	-	-	terve
9-1930	-	-	-	-	-	-	-	-	-	terve
9-1932		-	-	-	-	-	-	-	-	
9-1937	-	-	-	-	-	-	-	-	-	terve
9-1938	-	-	-	-	-	-	-	-	-	terve
9-1939	-	-	-	-	-	-	-	-	-	terve
9-1942	-	-	-	-	-	-	-	-	-	terve
9-1944	-	-	-	-	-	-	-	-	-	terve
9-1945	-	-	-	-	-	-	-	-	-	terve
9-2020	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	
9-2021	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	
9-2023	-	-	-	-	-	-	-	-	-	terve
9-2024										
9-2025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	terve
9-2026	-	-	-	-	-	-	-	-	-	terve
9-2027	-	-	-	-	-	-	-	-	-	terve
9-2028										

	testejä uusittava
	testejä kokonaan tekemättä

## 10.2 Mehutestaus

Molemmissa mehutestauksissa kaikkien siirrostusten tulos oli negatiivinen.

Testikasveissa ei ilmentynyt virusoireita. Ensimmäisen mehutestauksen testikasvien lehdissä havaittiin keltaisia kloroottisia pisteitä, keltaisia kloroottisia viiruja (ks. kuvio 5) sekä kuprua. Kaikilla ensimmäisen testauksen testikasveilla havaittiin vähintään yksi edellisistä oireista. Nämä oireet eivät kuitenkaan olleet varsinaisia virusoireita. Pisteitä, viiruja ja kuprua havaittiin testikasveissa huolimatta siitä, oliko testikasviin siirrostettu sairaan sipulin näytettä, terveen sipulin näytettä vai kontrollinäytettä. Toisen mehutestin testikasvien lehdissä ei havaittu juuri mitään oireita.



KUVIO 5. Keltaista kloroottista viirua testikasvin *Chenopodium amaranticolor* yhdessä siirrostetussa lehdessä (kuvassa oikealla)



### 10.3 Aineiston lisäys

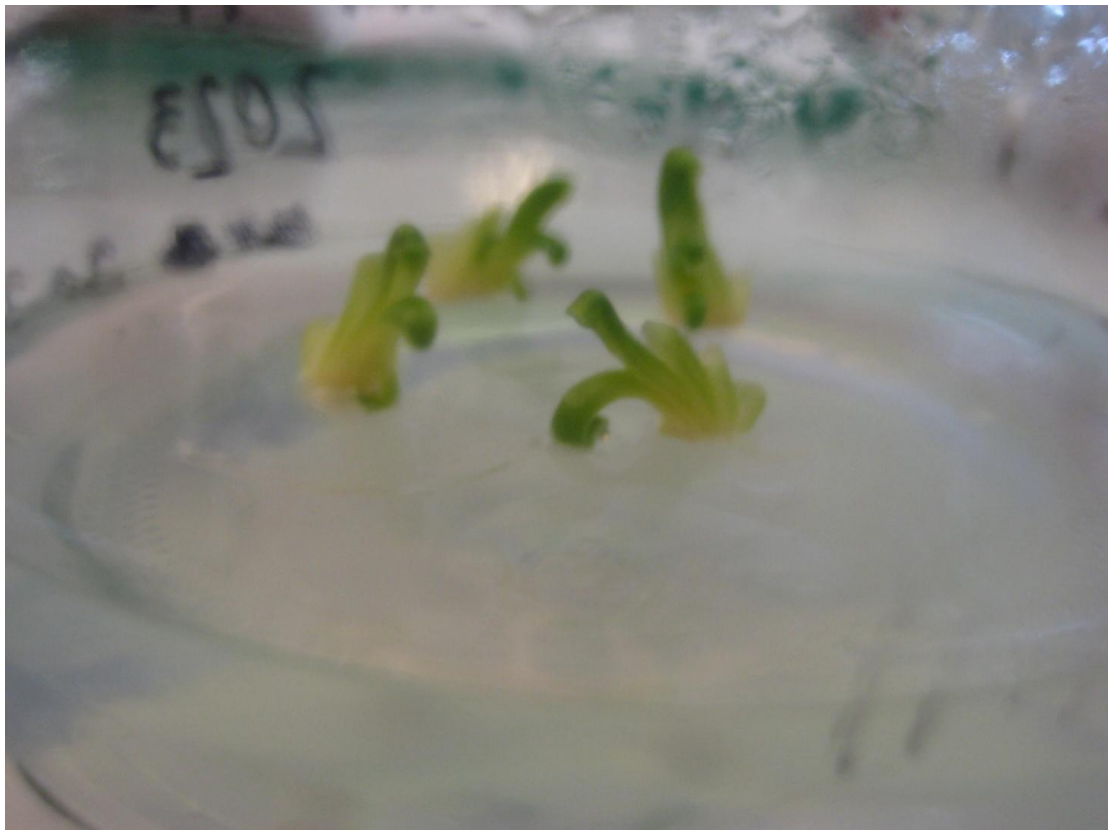
Varsikiekkomenetelmän harjoittelu kahdella valkosipulikannalla, onnistui hyvin.

Varsikiekoista saadut palat lähtivät versoamaan ja versoista pullistui sipuleita.

Varsikiekkomenetelmän kokeilu yhdellä varsinaisen valkosipuliaineiston sipulilla oli myös onnistunut. Varsikiekosta saadut palat lähtivät versomaan ja noin 11 viikon jälkeen versoista oli muodostunut kolme sipulia.

Työn valkosipuliaineiston varsikiekkomenetelmällä saadut palat alkoivat versota MS0-alustalla noin kolmen viikon kuluttua varsikiekkojen leikkaamisesta.

Tylppäkärkisiä kasvuja (ks. kuvio 6) alkoi kehittyä paloihin kahden viikon päästä varsikiekkolisäyksestä. Teräväkärkisiä kasvuja, eli versoja, alkoi kehittyä noin kolmen viikon kuluttua varsikiekkojen leikkaamisesta (ks. kuvio 7). Paloihin kehittyneistä versoista alkoi muodostua pullistumalla sipuleita noin neljän viikon kuluttua viipaloinnista.



KUVIO 6. Tylppäkärkisiä kasvuja varsikiekkomenetelmällä saaduissa paloissa



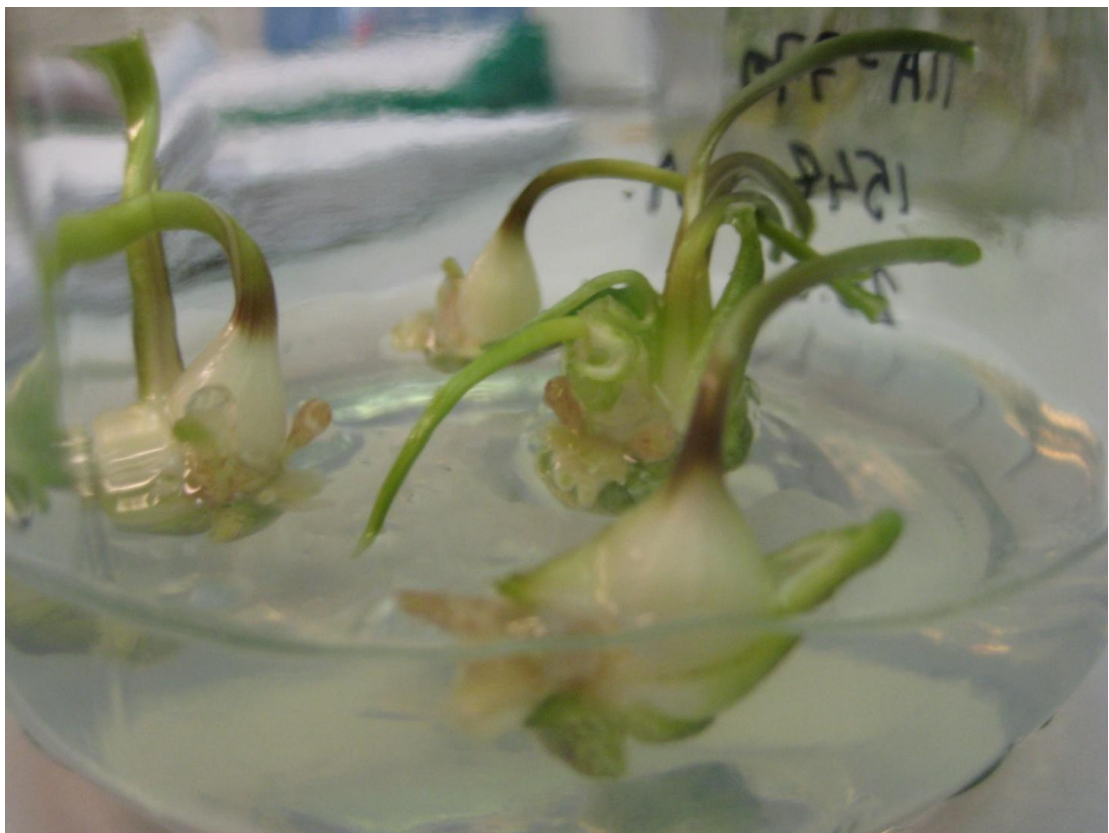


KUVIO 7. Teräväkärkisiä versoja. Edessä olevassa palassa versoista alkanut muodostua pullistumalla sipuleita (2 kpl).

Jokainen varsikiekkomenetelmällä lisätty valkosipuli lisääntyi (ks. taulukko 2) (ks. kuvio 8). Paras lisäystulos saatiin kasvupisteellä 9–1547. Tämän kasvupisteen sipuleiden määrä kasvoi yli kahdeksankertaisesti varsikiekkolisäyksen ansiosta.

TAULUKKO 2. Varsikiekkomenetelmän tuloksena saatujen valkosipuleiden määrät.

kasvupiste	sipuleiden määrä	
	ennen varsikiekkolisäystä	varsikiekkomenetelmän tuloksena
9-1547	2	17
9-1548	4	14
9-1554	3	13
9-1560	3	10
9-1562	1	3
9-1565	1	7
9-2020	1	6
9-2021	2	11
9-2023	3	10
9-2024	1	7
9-2025	1	6
9-2026	1	4
9-2027	1	5
9-2028	2	5



KUVIO 8. Varsikiekkomenetelmällä saatuihin paloihin kehittyneitä sipuleita

## **11 JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA**

### **11.1 Tulosten tarkastelu**

#### **ELISA-testaus**

ELISA-testaus oli onnistunut. ELISA-testin tulosten perusteella valkosipuliaineiston puhdistus lämpökäsittelyllä onnistui, sillä 80 % testatuista kasvupisteistä oli terveitä. Kolmen kasvupisteen testaus on edelleen kesken, sillä kasvupisteistä ei ole saatu riittävästi lehtinäytteitä testejä varten. Kaksi testeistä ovat kesken, koska heikosti positiiviset tulokset pitää tarkistaa. Nämä kaksi kasvupistettä testataan uudelleen heikosti positiivisen tuloksen antaneen viruksen osalta. Ennen valkosipuliaineiston puhdistusta otettujen sekanäytteiden vahvasti positiiviset ELISA-testitulokset osoittivat, että valkosipuliaineisto oli virussaastunut ennen sen puhdistusta.

ELISA-testaus on toimiva virustestausmenetelmä MTT Laukaan toimipisteessä. Yksi ELISA-testin ongelma on kuitenkin se, että joskus testi antaa vaikeasti tulkittavia tuloksia. Olisi hyvä jos tällaisten näytteiden tuloksen voisi varmistaa PCR-menetelmällä.

#### **Mehutestaus**

Tämän työn perusteella mehutestaus ei ole paras menetelmä valkosipulin virusten luotettavaan testaamiseen. Vaikka ennen valkosipuliaineiston puhdistusta otettujen sekanäytteiden ELISA-testitulokset olivat vahvasti positiivisia, saman aineiston näytteitä siirrostamalla ei syntynyt oireita mehutestikasveissa. Mahdollisia syitä mehutestauksen epäonnistumiselle ovat esimerkiksi näytteen liian lyhyt vaikutusaika testikasvin lehdellä, epäsopeva näytepuskuri, epäsopeva näytteen jauhamislämpötila tai siirrostuksen väärä ajankohta.

Mehutestauksen sijasta valkosipulin virusten testaamiseen olisi kannattavaa käyttää ELISA-testausta tai PCR-menetelmää. Jos MTT Laukaan toimipisteessä halutaan

käyttää mehutestausta valkosipulin virusten tutkimisessa, tulisi testauksen tekniikkaa kehittää. Huomiota pitäisi kiinnittää, edellä mainittujen testauksen epäonnistumisen mahdollisten syiden lisäksi, oireiden esilletuloa parantaviin tekniikoihin.

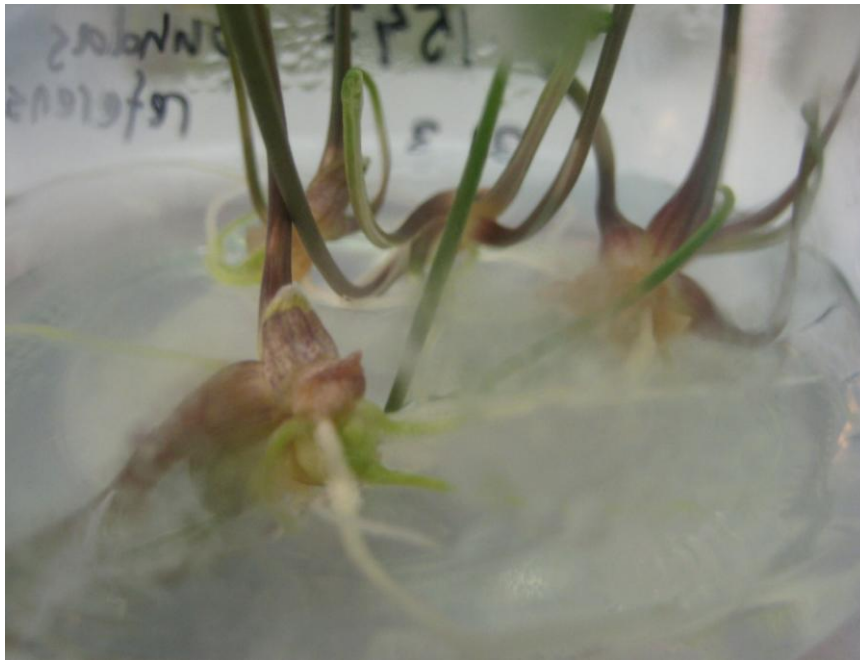
### **Aineiston lisäys**

Ennen varsikiekkomenetelmää valkosipuliaineiston lisääminen perustui aloituksista kasvaneiden sipulien jakaantumiseen. Tämä lisäysmenetelmä ei ollut toimiva sen hitauden takia. Lisäksi jotkut sipulit eivät jakaantuneet ja täten myöskään lisääntyneet ollenkaan.

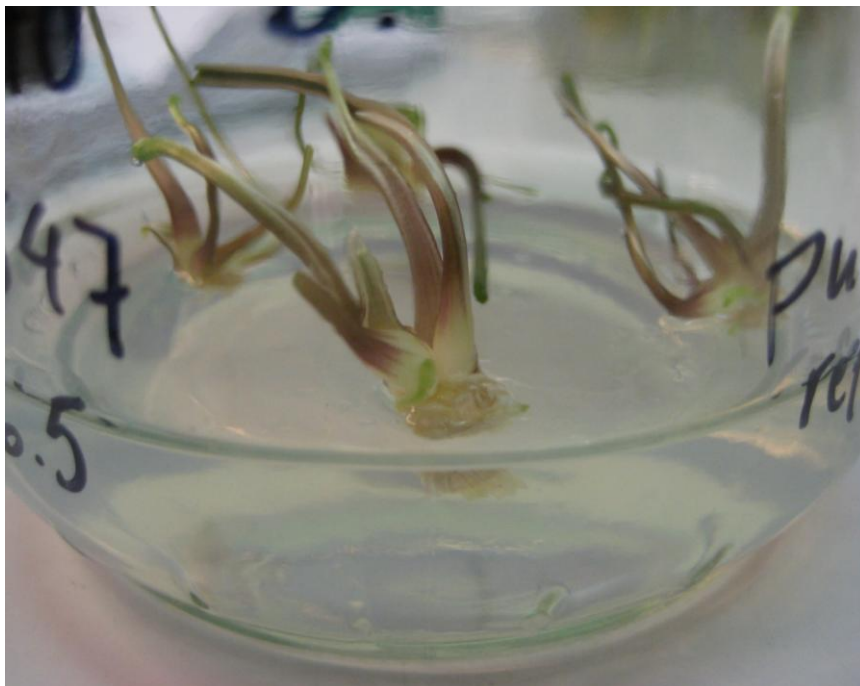
Valkosipuliaineiston lisäys varsikiekkomenetelmällä oli onnistunut.

Varsikiekkomenetelmällä saatiin lisättyä valkosipulia enemmän ja nopeammin kuin ennen käytetyllä jakamismenetelmällä. Menetelmän avulla saatiin kasvatettua mikroviljelyssä merkittävä määrä uusia valkosipuleita. Täysin varmasti ei tiedetä kuitenkaan ovatko varsikiekkomenetelmällä saadut sipulit muodostuneet kalluksesta, näin ollen on epävarmaa ovatko menetelmällä kasvatetut sipulit täysin emoyksilönsä kaltaisia.

Toistaiseksi tekniikka on ehkä hieman vaativa. Tekniikka vaatii hyvän mikroskoopin ja taitoa käsitellä *in vitro* -aineistoa. Varsikiekkomenetelmää kannattaisi kuitenkin kehittää ja harjoitella, jotta se voitaisiin ottaa käyttöön MTT Laukaan toimipisteessä. Esimerkiksi tulisi testata, missä vaiheessa mikroviljelypurkeista kannattaa karsia pois sipuleiden vihreitä osia (lehtiä) ja juuria, vai kannattaako karsimista tehdä ollenkaan. Tässä työssä sipulin vihreitä osia ja juuria karsittiin luultavasti väärään aikaan. Kun sipulit karsinnan yhteydessä siirrettiin uudelle MS0-alustalle, sipuleista suuri osa muuttui ajan kuluessa vihreiksi ja sipuleiden lehdet alkoivat rusehtaa. Kehittyneiden sipulinalkujen määrän laskeminen olisi kuitenkin ollut mahdotonta mikroviljelypurkista, jossa oli paljon sipulin lehtiä ja juuria (ks. kuvio 9). Työn kannalta oli kuitenkin tarpeellista saada laskettua kehittyneiden sipuleiden määrä (ks. kuvio 10). Tulevaisuudessa sipulin lehtien karsimista voitaisiin myöhäistää tai karsia lehtiä ja juuria vähemmän, näin voitaisiin päästä vielä parempiin tuloksiin lisättäessä valkosipulia varsikiekkomenetelmällä.



KUVIO 9. Mikroviljelypurkki ennen vihreiden osien karsimista



KUVIO 10. Kuviossa 9 oleva mikroviljelypurkki vihreiden osien karsimisen jälkeen. Karsinnan yhteydessä laskettiin sipulit.

## 11.2 Tulevaisuuden näkymiä

MTT Laukaan toimipaikassa ELISA-testausta tai PCR-menetelmää olisi toistaiseksi kannattavaa käyttää mehutestauksen sijaan, testattaessa valkosipulin viruksia.

Testatessa valkosipulin viruksia ELISA-testillä, olisi suositeltavaa käyttää PCR-menetelmää jos ELISA-testillä saadaan epävarmoja tuloksia.

Varsikiekkomenetelmällä saadut valkosipulinalut eivät jatkaneet kasvuaan toivotulla tavalla, kun ne oli siirretty uusiin MS0-mikroviljelypurkkeihin vihreiden osien ja juurten karsimisen jälkeen. Sipulinalut kuivatettiin, jonka jälkeen ne istutettiin kasvihuoneeseen turpeelle helmikuussa 2011. Sipulit ovat lähteneet hyvin kasvuun, mutta osalle näistä valkosipuleista saattaa olla tarpeen tehdä uusi ELISA-testaus, lehtiin ilmestyneiden mahdollisten virusoireiden vuoksi. Virusoireettomien valkosipuleiden kasvettua riittävään kokoon ne voidaan lähettää työn tilanneelle viljelijälle.

Puhdistetun terveen valkosipulaineiston jatkosäilytykseen kannattaa kiinnittää huomiota, jotta koko aineisto ei saastuisi viruksilla uudelleen viljelyn aikana. Osa puhdistetusta aineistosta olisi hyvä säilyttää *in vitro* -kasvatuksessa tai tallentaa aineistoa pitkäaikaissäilytykseen kryosäilytysmenetelmällä. Näillä menetelmillä ylläpidettävä aineisto olisi turvassa kasvitaudeilta- ja tuholaisilta.

## LÄHTEET

- Ahokas, H., Galambosi, B., Kairikko, H., Kallela, M., Sahramaa, M., Suojala-Ahlfors, T., Valo, R. & Veteläinen, M. 2006. Suomen kansallisten kasvigeenivarojen pitkäaikaissäilytysohjeet, vihannes-, yrtti- ja rohdoskasvit. Maa- ja elintarviketalous 85. MTT Jokioinen: Tampereen Yliopistopaino -Juvenes Print.
- Allium spp. n.d. FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm. Viitattu 26.4.2011. <http://ecoport.org/Resources/Refs/IPGRI/allium.pdf>
- Ayabe, M. & Sumi, S. 1998. Establishment of a novel tissue culture method, stem-disc culture, and its practical application to micropropagation of garlic (*Allium sativum* L.). Plant Cell Reports 17, 773–779.
- Bajaj, Y. P. S. & Reinert, J. 1977. Cryobiology of Plant Cell Cultures and Establishment of Gene-Banks. Teoksessa Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ Culture. Edit. Reinert, J. & Bajaj, Y. P. S. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 757-777.
- Bremer, K. 1983. Ydinkasvien tuottaminen kasvisolukkoviljelyn avulla. Tiedote No 38. Maatalouden tutkimuskeskus, kasvitautien tutkimuslaitos. Vantaa.
- Burns, R. (edit.). 2009. Plant Pathology Techniques and Protocols. USA: Humana Press.
- Campbell, N. A. & Reece, J. B. 2002. Biology. Sixth edition. San Francisco: Pearson Education.
- George, E. F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1. The Technology. 2. edition. Iso-Britannia: Butler & Tanner Ltd.
- George, E. F. 1993/1996. Plant Propagation by Tissue Culture. Part 2. In Practice. 2. edition. Iso-Britannia: Butler & Tanner Ltd.
- Haapala, T. & Niskanen, A-M. 1992. Pohjoisten puuvartisten kasvien mikrolisäys. Opetushallitus. Helsinki: VAPK-kustannus.
- Immunoassay Wikipedia ELISA. n.d. Tietoa ELISA-testistä GenWay Biotech sivustolla. Viitattu 29.5.2011. [http://www.genwaybio.com/gw\\_file.php?fid=6056](http://www.genwaybio.com/gw_file.php?fid=6056)
- Innovaatioita uusiutuvista luonnonvaroista. 2009. Viitattu 28.5.2011. <https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/mtt/mtt/esittely>
- Kasvintuotannon tutkimuksen varmennetun lisäys- ja taimiaineiston tuotantopaikkakohtainen menettelyohje ydinkasveille. 2007. Toim. J. Laamanen, S. Kauppinen ja M. Uosukainen. Laukaa. MTT.
- Keller, E. R. J. 2002. Cryopreservation of *Allium sativum* L. (Garlic). Teoksessa Biotechnology in Agriculture and Forestry 50. Cryopreservation of Plant Germplasm II. Edit. Towill, L. E. & Bajaj, Y. P. S. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 37–47.
- Kokkola, M. 1992. Valkosipulin virustaudit Suomessa ja viruksettomien istukkaiden tuottaminen solukkoviljelyn avulla. Sivulaudaturtyö. Helsingin yliopisto, Kasvibiologian laitos/ Kasvipatologia. Helsinki.

Laamanen, J. 2010. Tutkija. MTT Laukaa. Keskustelu 10.9.2010.

Leek yellow stripe virus. 1981. Descriptions of Plant Viruses. Association of Applied Biologists. Viitattu 26.4.2011. <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=240>

Lemmetty, A., Laamanen, J., Soukainen, M. & Tegel, J. 2011. Emerging virus and viroid pathogen species identified for the first time in horticultural plants in Finland in 1997–2010. *Agricultural and Food Science*, vol. 20, 29–41.

Linsmaier, E. M. & Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 18, 100–127.

Madigan, M. T. & Martinko, J. M. 2006. *Brock Biology of microorganism*. Eleventh edition. USA: Pearson Prentice Hall.

MTT Laukaa. 2009. Viitattu 28.5.2011.

<https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/mtt/mtt/esittely/toimipaikat/laukaa>

Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 3, volume 15, 473–497.

Onion Yellow Dwarf Virus polyclonal antibodies ex rabbit. n.d. Vasta-ainevalmistajan ohje OYDV:n DAS-ELISA-testille. Loewe Biochemica GmbH. Germany.

Puutarha.net. n.d. Valkosipulin kasvikortti. Viitattu 29.5.2011. <http://puutarha.net/>

Schwartz, H. F. & Mohan, S. K. 1995. *Compendium of Onion and Garlic Diseases*. The American Phytopathological Society. USA: APS PRESS.

Tirri, R., Lehtonen, J., Lemmetyinen, R., Pihakaski, S. & Portin, P. 2001. *Biologian sanakirja*. Uudistetun laitoksen 1. painos. Helsinki: Otava.

Triple Antibody Sandwich ELISA (TAS-ELISA). n.d. Vasta-ainevalmistajan ohje. DSMZ. Germany.

Uutta tietoa valkosipulin terveellisyydestä verisuonistolle. 2007. Artikkelit Aamiainen ruohikolla sivustolla. Viitattu 29.5.2011. [http://ruohikolla.blogspot.com/2007\\_10\\_01\\_archive.html](http://ruohikolla.blogspot.com/2007_10_01_archive.html)

Valkonen, J., Bremer, K. & Tapio, E. 2005. *Kasvi sairastaa -oppi kasvitaudeista*. 3. painos. Helsinki: Yliopistopaino.

Valkosipuli. n.d. Artikkelit Yrttitarha sivustolla. Viitattu 18.1.2011. <http://www.yrttitarha.com/kanta/valkosipuli/>

Vihannesviljely avomaalla 2010. 2010. Taulukko Maataloustilastot sivustolla. Viitattu 30.5.2011. <http://www.maataloustilastot.fi/puutarhatilastot>

Walkey, D. G. A. 1985. *Applied Plant Virology*. USA: Wiley-interscience publisher.

Wang, Q. C., Panis, B., Engelmann, F., Lambardi, M. & Valkonen, J. P. T. 2008. Cryotherapy of shoot tips: a technique for pathogen eradication to produce healthy planting materials and prepare healthy plant genetic resources for cryopreservation. *Annals of Applied Biology*, 351–363.



## LIITTEET

### Liite 1. Mehutestausohje valkosipulille

#### Testauksen periaate

Mehusiirrostuksen tarkoituksena on testata mehulevintäisten viruksien esiintymistä testattavassa valkosipulissa. Testattavan valkosipulin mehua siirrostetaan herkkään testikasviin, jossa kehittyvät virukselle ominaiset oireet tai jossa virus lisääntyy tehokkaasti. Mehutestikasveina valkosipulille käytetään savikoita (*Chenopodium* ssp.). Testattavasta valkosipulista otettu näyte jauhetaan puskurin kanssa. Syntynyttä mehua siirrostetaan nuoren mehutestikasvin lehdille, joille on ripoteltu Carborundum-jauhetta (jauhe rikkoo testikasvin solukkoa ja auttaa viruspartikkeleita siirtymään testikasviin). Carborundum:in kemiallinen kaava on SiC. Testikasvin lehdet huuhdellaan kylmällä vedellä ja testikasvit siirretään kasvihuoneeseen. Testikasveja kasvatetaan kasvihuoneessa noin 40 vrk, jonka aikana testikasvien oireita havainnoidaan. Eri testikasvilajeissa ilmenevät oireet voivat antaa viitteitä kyseessä olevasta viruksesta.

Mehutestauksessa käytettävät näytteet (0,3 g tai 0,5 g/näyte) otetaan testattavien valkosipuleiden lehdistä ja näytteet säilytetään pakastettuina testaukseen asti.

#### Suoritus

Fosfaattipuskuri 0,05 M + 2 % PVP, pH 7

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,663 g liuota pieneen määrään tislattua vettä

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1,357 g liuota pieneen määrään tislattua vettä

Kaada liuokset 250 ml mittapulloon ja täytä tislattulla vedellä.

Lisää 5 g PVP:tä (polyvinylpyrrolidone mol. wt.10000).

Mehutestikasveja pidetään pimeässä yön yli ennen mehusiirrostusta.

1. Jokaisesta testikasvista merkitään siirrostettavat (3 kpl) lehdet rei'ittämällä.
2. Merkityille lehdille sirotellaan Carborundum-jauhetta.
3. Näyte (sairas/terve) jauhetaan jauhimella kaksipuolisessa näytepussissa (Bioreba 12 x 14 cm) fosfaattipuskurin kanssa suhteessa: 0,5 g näytettä/ 5 ml puskuria
4. Siirrostettavia lehtiä sivellään hellävaroen edellä valmistettuun mehuun kastetulla vanupuikolla
5. Siirrostuksen jälkeen jokaista lehteä huuhdellaan kylmällä vedellä 30 sek. (yksi testikasvi kerrallaan)

6. Testikasvit tuetaan tikuilla
7. Testikasvit laitetaan pimeään yön yli, jonka jälkeen ne siirretään kasvihuoneeseen
8. Oireita havainnoidaan 5–7 vrk:n välein noin 40 vrk:n ajan

## Liite 2. ELISA-testausohje



### Onion Yellow Dwarf Virus polyclonal antibodies ex rabbit

OYDV

11.6-10

Cat. No. 07111  
Control 10507072

#### ELISA-Set

100 Tests

500 Tests

Anti-Virus-IgG

0.1 ml

0.5 ml

Anti-Virus-IgG-AP-conjugate<sup>A</sup>

0.1 ml

0.5 ml

#### Dilution in assay

IgG

1 : 200 in coating buffer

Conjugate

1 : 200 in Conjugate/Sample Buffer LOEWE II

#### Sample preparation

Sample buffer  
Leaves, bulbs

Standard Conjugate/Sample buffer  
Final dilution 1 : 20 w/v

Analytical Data  
(E<sub>405nm</sub> measured against  
substrate solution as blank)

Positive control > 3.0  
Detection limit 1 : 10 000  
in our lyophilized standard

#### Negative Controls

Leek leaves 0.014  
Onion leaves 0.028

Determined after 1 hour's incubation at room  
temperature using Nunc MaxiSorp™ certified plates.  
Volume / well: 0.2 ml

#### Cross reactions

LYSV not detected  
SLV not detected  
SYSV not detected

Shelf Life minimum  
when stored unopened at  
+4°C.

see back of the label

Quality Control Manager

For any further information: [www.loewe-info.com](http://www.loewe-info.com) and [service@loewe-info.com](mailto:service@loewe-info.com)

# LOEWE

## DAS ELISA using LOEWE II for AP-Conjugate Dilution only

### I Assay Principle of the classical ELISA Double Antibody Sandwich technique

During the first step of incubation the surface of the microtiter plate is coated with the antigen specific antibody. During the second incubation step, the antigen is bound to the fixed antibody forming the antibody-antigen complex. During the third incubation step the antibody-antigen complex reacts with the AP-labeled antibody forming the double antibody sandwich. This is followed by the enzymatic assay whereby the presence of the specific antigen is indicated by the positive reaction of alkaline phosphatase with 4-nitrophenyl-phosphate yielding free 4-nitrophenol. The enzymatic reaction is monitored at 405 nm, after 1 and 2 hours.

### II Assay procedure

Procedure	Reagent	Volume / well	Incubation time	Incubation temperature	Washing steps*
incubation of the antibody	IgG, <b>diluted 1:200</b> in coating buffer	0.2 ml	4 h	37°C	4 x
formation of the antibody-antigen-complex	Sample dilution 1:20 in conjugate/sample buffer <b>Controls</b> have to be diluted with <b>1 ml</b> of standard conjugate / sample buffer,	0.2 ml	over night	4°C	4 x
application of the antibody-AP-conjugate	antibody-AP-conjugate, <b>diluted 1:200</b> in conjugate/sample buffer <b>LOEWE II</b>	0.2 ml	4 h	37°C	4 x
enzymatic assay	substrate solution	0.2 ml	1 - 2 h	room temp.	-

**\*Washing:** After each incubation step, the reagent has to be removed from the plate, followed by 4 washing steps using an automatic washer. 1 washing step includes 2 x short washing (fill in and remove) followed by 2 x 3 minutes incubation of the wash buffer before removal.

### III Formulations

<b>Coating Buffer:</b>	1.59 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 2.93 g NaHCO <sub>3</sub>	Dissolve in distilled water, and dilute to 1l. Adjust pH 9.6
<b>Wash Buffer:</b>	8.0 g NaCl 2.9 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O 0.2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.2 g KCl 0.5 ml Tween 20	Dissolve in distilled water and dilute to 1l. Adjust pH 7.2 - 7.4
<b>Sample Buffer</b> corresponds to the classical Standard <b>Conjugate/Sample Buffer:</b>	20 g polyvinyl pyrrolidone (viscosity K10 - K40) <b>2 g bovine serum albumin (BSA)</b> 0.1 g NaN <sub>3</sub> wash buffer formula for 1 l	Dissolve in distilled water and dilute to 1l. Adjust pH 7.4
<b>LOEWE II buffer for conjugate dilution</b> corresponds to the same Standard <b>Conjugate/Sample Buffer,</b> <b>however BSA is replaced by Blocking Milk:</b>	20 g polyvinyl pyrrolidone (viscosity K10 - K40) <b>50 g Blocking Milk</b> 0.1 g NaN <sub>3</sub> wash buffer formula for 1 l	Dissolve in distilled water and dilute to 1l. Adjust pH 7.4
<b>Substrate Buffer</b>	97 ml diethanolamine 0.2 g MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	Dissolve in distilled water and dilute to 1l. Adjust pH to 9.8 with 1 N HCl
<b>Substrate Solution</b>	1 mg/ml 4-nitrophenyl phosphate di-Na-salt in substrate buffer	Prepare this solution immediately prior to use!

**Evaluation:** We strongly advise to add positive as well as negative controls to the plate. To determine the healthy background, several fresh extracts of healthy plants of the same species should also be added to the plate. The threshold +/- has to be determined by the user.

Sup. 15.5.2009

SLV = Shalldot latent virus

100 tests

DSMZ - Plant Virus Collection  
Inhoffenstr. 7 B  
38124 Braunschweig, Germany



## Triple Antibody Sandwich ELISA (TAS-ELISA)

Before opening the tubes containing Coating Antibody (IgG), MAb and RAM-AP- Conjugate (RAM-AP).

**Centrifuge!!** To collect the content at the bottom of the tube.

1. Dilute purified IgG in coating buffer (recommended dilution see delivery note and tube).  
i.e. for 100 tests: 20 µl in 20 ml buffer at a recommended dilution of 1:1000; 40 µl in 20 ml buffer at a recommended dilution of 1:500. Or at equal ratios for other volumes.  
Add 200 µl to each well of a microtitre plate.
2. Incubate at 37 °C for 2-4 h.
3. Wash plate with PBS-Tween using wash bottle, soak for a few minutes and repeat washing two times. Blot plates by tapping upside down on tissue paper.
4. Add 200 µl of 2% skim milk in PBS-Tween to each well (blocking). 30 min at 37°C
5. Remove blocking solution and tap dry.
6. Add 200 µl aliquots of the test sample (extracted in sample extraction buffer) to duplicate wells.
7. Incubate overnight at 4 °C.
8. Wash three times as in step 3.
9. Add 200 µl of the MAb in appropriate (recommended dilution see delivery note and tube label) in conjugate buffer to each well.
10. Incubate at 37 °C for 2-4 h.
11. Wash three times as in step 3.
12. Add 200 µl of RaM-ap in appropriate dilution in conjugate buffer to each well.
13. Incubate at 37 °C for 2 hours.
14. Wash three times as in step 3.
15. Add 200 µl aliquots of freshly prepared substrate (10 mg p-nitrophenyl phosphate [Sigma, Fluka] dissolved in 10 ml of substrate buffer) to each well. Incubate at room temperature for 30-60 min, or as long as necessary to obtain clear reactions
16. Assess results by:
  - a) Visual observation
  - b) Spectrophotometric measurement of absorbance at 405 nm

### Reference

Clark, M. F. and A. N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34: 475-483.

### Buffers used in ELISA

#### 1. Coating buffer (pH 9.6)

1.59 g sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )  
 2.93 g sodium bicarbonate ( $\text{NaHCO}_3$ )  
 0.20 g sodium azide ( $\text{NaN}_3$ )  
*Dissolve in 900 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , adjust pH to 9.6 with HCl and make up to 1 l.*

1

#### 2. PBS (pH 7.4) phosphate buffered saline

8.0 g sodium chloride ( $\text{NaCl}$ )  
 0.2 g monobasic potassium phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )  
 1.15 g dibasic sodium phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )  
 0.2 g potassium chloride ( $\text{KCl}$ )  
 0.2 g sodium azide ( $\text{NaN}_3$ )  
*Dissolve in 900 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , adjust pH to 7.4 with NaOH or HCl and make up to 1 l.*

#### 3. PBS-Tween (PBST)

PBS + 0.5 ml Tween 20 per liter

#### 4. Sample extraction buffer (pH 7.4)

PBST + 2% PVP (Serva PVP-15 polyvinyl pyrrolidone)

#### 5. Conjugate buffer

PBST + 2% PVP + 0.2% egg albumin (Sigma A-5253)

#### 6. Substrate buffer

97 ml diethanolamine  
 600 ml  $\text{H}_2\text{O}$   
 0.2 g sodium azide ( $\text{NaN}_3$ )  
*Adjust to pH 9.8 with HCl and make up to 1 liter with  $\text{H}_2\text{O}$*

Buffers can be stored at 4 ° C for at least 2 months. Warm to room temperature before use.

## ELISA Troubleshooting

### 1. No color development

- a) Did you omit any steps?
- b) Did you use correct buffer for each step?
- c) Is your enzyme OK? Serum OK?
- d) Is your positive control homologous to antiserum (IgG)?

*Recommendations* - Do a titration plate. Use reliable positive control in each plate. Pretest enzyme conjugate on substrate. Check purified IgG for antigen-specific IgG.

### 2. Nonspecific color development

- a) If in edge wells only:
  - Make sure the humidity in the incubator is sufficiently high.
  - If this does not help, don't use edge or border wells, fill with buffer only.
- b) If in whole plate:
  - incomplete washing
  - old substrate
  - error in loading sequence
  - conjugate still contains glutaraldehyde: dialyse again

*Recommendations* - Use reliable negative control in each plate. Absorb antiserum against healthy plant extract. Use fresh substrate and check for spontaneous color change. Cover plates. Check pH of the buffers used.

- c) Some wells with inconsistent or unexpected reactions
  - incomplete washing
  - error in loading test antigens
  - spillage between wells

*Recommendations* - Use extra wash step, handle plates carefully with lids on, use predetermined loading pattern before loading. Blot top of plate after rinsing.

### 3. Color development very rapid; some color in healthy samples

- a) Enzyme conjugate concentration too high
- b) Substrate concentration too high

*Recommendations* - Use enzyme conjugate and substrate concentrations that will give  $OD_{405\text{ nm}}$  of about 1.0 in 30 to 60 min with good antigen source.

## DAS-ELISA

### Vasta-ainetoimittaja DSMZ

Sentrifugoi vasta-aine (IgG) ja konjugaatti (IgG-AP) putket ennen avaamista.

1. Liuota vasta-aine (IgG) kiinnityspuskuriin (katso laimennossuhde putkesta). Pipetoi liuosta 200 µl/kuoppa.
2. Inkuboi 37 °C:ssa 2-4 tuntia.
3. Pese levy 3 kertaa PBS-Tween:llä. (1. pesun välissä 3 min tauko)
4. Pipetoi näytepuskurissa jauhettuja näytteitä 200 µl/kuoppa.
5. Inkuboi yön yli 4 °C:ssa.
6. Pese levy 3 kertaa PBS-Tween:llä.
7. Liuota konjugaatti (IgG-AP) konjugaattipuskuriin (katso laimennossuhde putkesta). Pipetoi liuosta levyille 200 µl/kuoppa.
8. Inkuboi 37 °C:ssa 4 tuntia.
9. Pese levy 3 kertaa PBS-Tween:llä.
10. Valmista substraattiliuos liuottamalla 10 mg p-nitrophenyl phosphate/10 ml substraattipuskuria. Inkuboi huoneenlämmössä 30-60 min. tai kauemmin.
11. Tulkitse tulokset silmävaraisesti ja absorbanssilla 405 nm.

## TAS-ELISA

### Vasta-ainetoimittaja DSMZ

Sentrifugoi vasta-aine (IgG), MAb ja RAM-AP-konjugaatti (RAM-AP) putket ennen avaamista.

1. Liuota vasta-aine (IgG) kiinnityspuskuriin (katso laimennossuhde putkesta). Pipetoi liuosta 200 µl/kuoppa.
2. Inkuboi 37 °C:ssa 2-4 tuntia.
3. Pese levy 3 kertaa pesupuskurilla (PBS-Tween). (1. pesun välissä 3 min tauko)
4. Lisää 2 % rasvatonta maitoa (maitojauhetta?) pesupuskuriin. Pipetoi liuosta 200 µl/kuoppa (blocking) ja inkuboi 37 °C:ssa 30 min.
5. Poista neste kuopista ja taputa levy kuivaksi.
6. Pipetoi näytepuskurissa jauhettuja näytteitä 200 µl/kuoppa.
7. Inkuboi yön yli 4 °C:ssa.
8. Pese levy 3 kertaa pesupuskurilla (PBS-Tween)
9. Liuota MAb konjugaattipuskuriin (katso laimennossuhde putkesta). Pipetoi liuosta levyille 200 µl/kuoppa.
10. Inkuboi 37 °C:ssa 2-4 tuntia.
11. Pese levy 3 kertaa pesupuskurilla.
12. Liuota RAM-AP konjugaattipuskuriin (katso laimennossuhde putkesta). Pipetoi liuosta levyille 200 µl/kuoppa.
13. Inkuboi 37 °C:ssa 2 tuntia.
14. Pese levy 3 kertaa pesupuskurilla.
15. Valmista substraattiliuos liuottamalla 10 mg p-nitrophenyl phosphate/10 ml substraattipuskuria. Inkuboi huoneenlämmössä 30-60 min. tai kauemmin.
16. Tulkitse tulokset silmävaraisesti ja absorbanssilla 405 nm.

Näyte: Näytteen ja näytepuskurin suhde on 1:20. Kasvinäyte ja näytepuskuri laitetaan kaksiosaisen näytepussin tekstipuolen osaan. Näytepuskuriä laitetaan ensin 5 ml. Kasvinäyte jauhetaan näytepussissa (Bioreba 12 x 14 cm) pussin tekstipuoli pöytää vasten. Lisätään loppu näytepuskuri ja painellaan pussia -> näytepuski näytteineen jääkaappiin odottamaan.



### Liite 3. Kaikkien ELISA-testien tulokset

#### Ensimmäinen erä:

kasvupiste	ELISA-tulokset 10.-11.9.2009			
	OYDV	LYSV	SLV	GarCLV
9-1547	-	-	-	-
9-1548	(+)	-	-	-
9-1553	+	+	+	-
9-1554	-	-	(+)	-
9-1556	-	+	+	-
9-1557	+	+	+	-
9-1559		(+)	-	-
9-1560		-	-	-
9-1562		(+)	-	-
9-1564	-	-	-	-
9-1565		-	-	-
9-1923				
9-1924				
9-1926				
9-1928				
9-1929				
9-1930				
9-1932				
9-1937				
9-1938				
9-1939				
9-1942				
9-1944				
9-1945				
9-2020				
9-2021				
9-2023				
9-2024				
9-2025				
9-2026				
9-2027				
9-2028				

	terve
	sairas
	testejä uusittava
	testejä kokonaan tekemättä

**Toinen erä:**

kasvupiste	ELISA-tulokset 3.12.2009				
	GarV-A	GarV-B	GarV-C	GarV-D	SYSV
9-1547	-	-	-	-	-
9-1548	-	-	-	-	-
9-1553	-	-	-	-	-
9-1554	-	-	-	-	-
9-1556	-	-	-	-	-
9-1557	-	-	-	-	-
9-1559	-	-	-	-	-
9-1560	-	-	-	-	-
9-1562	-	-	-	-	-
9-1564	-	-	-	-	-
9-1565	-	-	-	-	-
9-1923	-	-	-	-	-
9-1924	-	-	-	-	-
9-1926	-	-	-	-	-
9-1928	-	-	-	-	-
9-1929	-	-	-	-	-
9-1930	-	-	-	-	-
9-1932	-	-	-	-	-
9-1937					
9-1938	-	-	-	-	-
9-1939	-	-	-	-	-
9-1942					
9-1944	-	-	-	-	-
9-1945	-	-	-	-	-
9-2020					
9-2021					
9-2023					
9-2024					
9-2025					
9-2026					
9-2027					
9-2028					

	terve
	sairas
	testejä uusittava
	testejä kokonaan tekemättä

**Kolmas erä:**

kasvupiste	ELISA-tulokset 17.3.2010			
	OYDV	LYSV	SLV	GarCLV
9-1547				
9-1548	-			
9-1553				
9-1554			-	
9-1556				
9-1557	+	+	+	-
9-1559	-	-		
9-1560	-			
9-1562	-	+		
9-1564				
9-1565	-			
9-1923	-	(+)	-	-
9-1924	-	-	-	-
9-1926	-	+	-	-
9-1928	-	-	-	-
9-1929	-	-	-	-
9-1930	-	-	-	-
9-1932		-	-	-
9-1937	-	-	-	-
9-1938	-	-	-	-
9-1939	-	-	-	-
9-1942	-	-	-	-
9-1944	-	-	-	-
9-1945	-	-	-	-
9-2020				
9-2021				
9-2023				
9-2024				
9-2025				
9-2026				
9-2027				
9-2028				

	terve
	sairas
	testejä uusittava
	testejä kokonaan tekemättä

## Neljäs erä:

kasvupiste	ELISA-tulokset 24.11.2010								
	GarV-A	GarV-B	GarV-C	GarV-D	SYSV	OYDV	LYSV	SLV	GarCLV
9-1547									
9-1548									
9-1553						-			
9-1554									
9-1556									
9-1557									
9-1559									
9-1560									
9-1562									
9-1564									
9-1565									
9-1923							-		
9-1924									
9-1926									
9-1928									
9-1929									
9-1930									
9-1932									
9-1937	-	-	-	-	-				
9-1938									
9-1939									
9-1942	-	-	-	-	-				
9-1944									
9-1945									
9-2020	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-
9-2021	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-
9-2023	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9-2024									
9-2025	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9-2026	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9-2027	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9-2028									

	terve
	sairas
	testejä uusittava
	testejä kokonaan tekemättä



